

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Department für Innere Medizin

Abteilung Innere Medizin IV

(Schwerpunkte: Endokrinologie, Diabetologie, Angiologie,
Nephrologie und Klinische Chemie)

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H.-U. Häring

Untersuchungen zur Regulation der Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrates-1 an Serin 318

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hendrik Fiedler

aus

Celle

2008

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-U. Häring

2. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. G. Stangl

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Bedeutung des Diabetes mellitus Typ 2.....	8
1.2 Signaltransduktion	9
1.3 Phosphorylierung als Modulator der Signaltransduktion.....	9
1.4 Die Weiterleitung des Insulinsignals	10
1.5 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz	11
1.6 Phosphorylierung von IRS-1	12
1.7 Ser318-Phosphorylierung von IRS-1	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Antikörper.....	17
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.4 Geräte	19
2.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultur.....	21
2.2.2 Herstellung von Zelllysaten	22
2.2.3 Proteinbestimmung	23
2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.2.5 Western-Blotting.....	24
2.2.6 JNK-Aktivitäts-Immunoassay	25
2.2.7 Densitometrie und statistische Analyse.....	26
3. Ergebnisse	27
3.1 Die TPA- und Insulin-abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318	27
3.2 Die Rolle der Shp2 bei der Phorbol-ester-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318	32

3.3 Die Rolle von JNK und PI3-Kinase/mTOR bei der Insulin-induzierten IRS-1-Ser318-Phosphorylierung.....	33
3.4 Aktivierung der JNK und des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges führt zur Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318	38
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung.....	47
6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	48
7. Abbildungen und Tabellen	51
7.1 Abbildungen.....	51
7.2 Tabellen.....	52
8. Literaturverzeichnis	53
9. Danksagung.....	58
10. Lebenslauf	59

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikationen, Vorträge und Posterabstracts eingegangen:

Publikationen:

- **Müssig, K.; Fiedler, H.; Staiger, H.; Weigert, C.; Lehmann, R.; Schleicher, E. D.; Häring, H. U.**, Insulin-induced stimulation of JNK and the PI3K/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 335 [3]: 819-825 (2005)
- **Müssig, K.; Staiger, H.; Fiedler, H.; Moeschel, K.; Beck, A.; Kellerer, M.; Häring, H. U.**, Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. *J.Biol.Chem.* 280 [38]: 32693-32699 (2005)

Vorträge:

- **Fiedler, H.**; Die Rolle der Shp2 bei der Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318, Colloquium Endocrinologicum Südwestdeutscher Arbeitsgruppen, 26.11.2004, Mainz

Posterabstracts:

- **Fiedler, H.; Müssig, K.; Staiger, H.; Häring, H.U.**, JNK, mTOR und PI3-Kinase sind an der Insulin-stimulierten Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 beteiligt, Kongress der Südwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 21.-22.10.2005, Stuttgart

- **Fiedler, H.; Müssig, K.; Staiger, H.; Haap, M.; Häring, H.U.**, Imatinib beeinflusst nicht die negative Feed-back-Regulation der Insulinsignalkaskade in C2C12-Myotuben, *Diabetes und Stoffwechsel* [1], 98, 242 (2006), Kongress der Deutschen Diabetes Gesellschaft DDG, 24.-27.05.2006, Leipzig
- **Fiedler, H.; Müssig, K.; Staiger, H.; Haap, M.; Häring, H.U.**, Negative Regulatory Events Of Insulin Signaling Are Not Affected By Imatinib In C2C12 Myotubes, *Diabetes* 55 [1], A563, 2432-PO (2006), Kongress der American Diabetes Association ADA, 09.-13.06.2006, Washington, DC, USA

1. Einleitung

1.1 Bedeutung des Diabetes mellitus Typ 2

Der Typ-2-Diabetes, der ca. 95 % aller Diabeteserkrankungen überhaupt ausmacht [Ratzmann, K. P., 1991], ist eine Epidemie unserer Zeit. Diese Erkrankung betrifft weltweit etwa 150 Millionen Menschen [Bazzano, L. A. et al., 2005]. In Deutschland sind schätzungsweise 8,2 % der Gesamtbevölkerung, d.h. 6,7 Millionen Menschen betroffen [Palitzsch, K.-D. et al., 1999]. Der Insulinresistenz kommt entscheidende Bedeutung bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 zu [Beck-Nielsen, H. et al., 1994]. Nach lang bestehender Insulinresistenz und daraus resultierender kompensatorisch gesteigerter Insulinproduktion der β -Zellen kommt es schließlich zu einer Erschöpfung der Insulinsekretion, dem zweiten wichtigen Faktor in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes [DeFronzo, R. A. et al., 1992]. Die Inzidenz des Typ-2-Diabetes und aller daraus resultierenden Folgererkrankungen, wie der diabetischen Retinopathie, Nephropathie oder Polyneuropathie sowie des erhöhten kardiovaskulären Risikos, ist in den letzten Jahren weltweit rasant angestiegen und wird nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO auch in Zukunft weiter ansteigen [Campbell, I. W., 2001]. Man geht davon aus, dass im Jahre 2030 weltweit 366 Millionen Menschen an Typ-2-Diabetes leiden werden [Wild, S. et al., 2004]. Neben der Prävention des Typ-2-Diabetes durch Umstellung der Lebensgewohnheiten (vermehrte körperliche Bewegung sowie kalorienreduzierte, fettmodifizierte und ballaststoffreiche Kost) kommt daher auch dem Verständnis der molekularen Mechanismen, die an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sind, größte Bedeutung zu, da sich hieraus möglicherweise neue therapeutische Ansätze ergeben könnten. Die molekularen Ursachen der Insulinresistenz sind in der Beeinträchtigung der Insulin-Signaltransduktion zu sehen.

1.2 Signaltransduktion

Der Begriff der Signaltransduktion beschreibt die Bindung eines extrazellulären Liganden an seinen mehr oder weniger spezifischen Rezeptor an der Zellmembran, im Zytosol oder im Zellkern, die zur Auslösung eines Signals führt, welches in einer oder mehreren Signalkaskaden in der Zelle weitergeleitet werden kann. Somit ist die Signaltransduktion das entscheidende Mittel der Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und damit unerlässlich für jedes Gewebe, jedes Organ und jeden vielzelligen Organismus, um zelluläre Prozesse, wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Zellmorphologie oder Zellbewegung, zu steuern.

Hydrophile Substanzen können die Zellmembran nicht passieren und binden daher extrazellulär an Rezeptoren, die das Signal durch Konformationsänderung an ihre zytosolische Domäne nach intrazellulär weiterleiten. Durch die Vielzahl der beteiligten Proteine innerhalb einer Signalkaskade ist die Signaltransduktion eine hervorragende Möglichkeit der Zelle, Stärke und Dauer der zellulären Antwort auf einen Stimulus von extrazellulär exakt regulieren zu können [Voet, D et al., 2002].

1.3 Phosphorylierung als Modulator der Signaltransduktion

Extrazelluläre Stimuli, wie Hormone, Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren, sind also Auslöser eines Signals, für dessen Weiterleitung in die Zelle verschiedene Wege zur Verfügung stehen. Einerseits kann es elektrophysiologisch durch Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen zu Potentialänderungen an der Membran oder aber zu sterischen Strukturveränderungen kommen, andererseits aber auch zur chemischen Modifikation von Signalmolekülen. Wichtige Komponenten intrazellulärer Signaltransduktion sind Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, regulatorische Guanosin triphosphat (GTP)-asen und sogenannte Adaptermoleküle. Der Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Serin- und Threoninresten

kommt dabei eine entscheidende regulatorische Bedeutung zu. Bei vielen Signaltransduktionswegen ist die Bedeutung reversibler Phosphorylierungen (sog. Interkonvertierung) als Steuermechanismus heute nachgewiesen. Durch Phosphorylierung an Serin oder Threonin ändert sich der Ladungszustand des gesamten Proteins und infolgedessen auch dessen Funktion. Phosphorylierungen haben beispielsweise Einfluss auf die biologische Aktivität oder aber die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen.

1.4 Die Weiterleitung des Insulinsignals

Die Signaltransduktion des Insulins ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Wichtige Schritte dieses komplexen Systems sind in **Abb. 1** zusammengefasst:

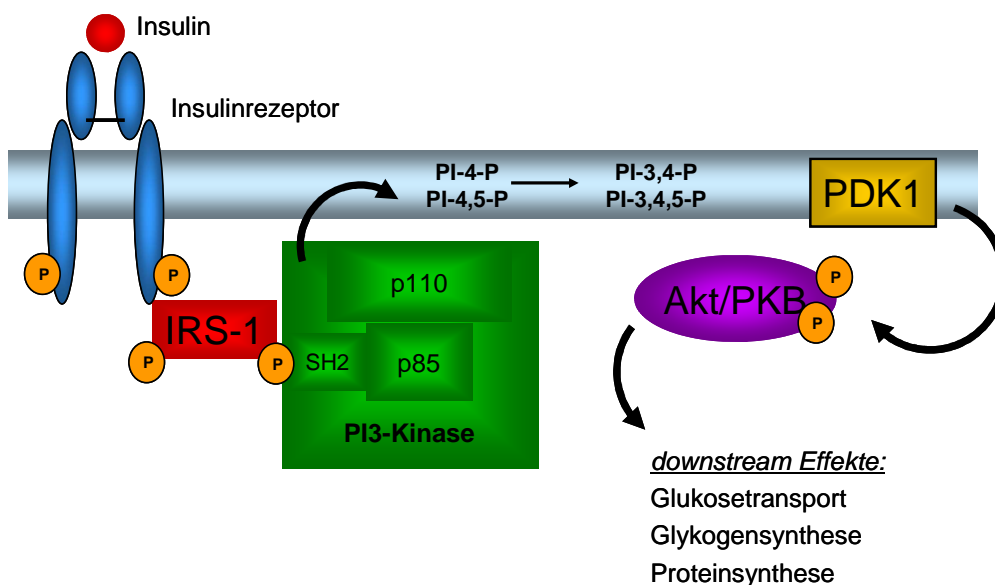


Abb. 1: Ausschnitt aus der Insulinsignalkaskade.

Insulin bindet an einen spezifischen transmembranären Rezeptor. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der rezeptoreigenen Tyrosinkinase und infolgedessen zur Autophosphorylierung an Tyrosinresten des Insulinrezeptors (IR). Durch weitere Tyrosinphosphorylierungen kann das Insulinsignal

anschließend an verschiedene Substrate weitergeleitet werden [White, M. F. et al., 1989; White, M. F. et al., 1994; Kasuga, M. et al., 1982]. Zu den wichtigsten direkten Substraten des IRs zählen die Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS), von denen wiederum besonders den IRS-1-4 eine große Bedeutung zukommt [White, M. F., 1998]. Sie leiten das Insulinsignal weiter zur Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase, die aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85) mit 2 SH-Domänen besteht und ein zentrales Element innerhalb der Insulinsignalkaskade darstellt, da sie u.a. als Schnittstelle zwischen Tyrosin- und Serinphosphorylierungskaskaden fungiert [Shepherd, P. R. et al., 1998]. Die Aktivierung der PI3-Kinase bewirkt eine Phosphorylierung membrangebundener Phosphoinositide an Position 3 des Inositolrings (PI-4-P und PI-4,5-P werden phosphoryliert, so dass PI-3,4-P und PI-3,4,5-P entsteht). So können in der Folge die PH-Domänen von Protein-Kinase-B (PKB)/Akt und der Phospholipid-abhängigen Kinase 1 (engl.: phospholipid-dependent-kinase; PDK) genau an dieser Stelle binden [Cohen, P. et al., 1997; Alessi, D. R. et al., 1997]. Dieser Signalweg ist an vielen Insulin-induzierten Effekten, wie z.B. dem Glukosetransport, der Glykogen- oder der Proteinsynthese beteiligt.

1.5 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz

Sowohl für Rezeptor- als auch Postrezeptordefekte konnte gezeigt werden, dass sie zu der Entwicklung von Insulinresistenz bei Typ-2-Diabetikern beitragen. Auf Rezeptorebene wurden zum einen eine Verminderung der Anzahl der in der Zellmembran gelegenen Rezeptoren und zum anderen Defekte in der Internalisierung und Prozessierung beschrieben [Molina, J. M. et al., 1989; Trichitta V et al., 1989].

Darüber hinaus wurde bei Patienten mit Typ-2-Diabetes in Insulin-empfindlichen Geweben, wie etwa dem Skelettmuskel, eine verminderte Tyrosinkinaseaktivität des IRs gefunden, die nicht durch Veränderungen der Rezeptorzahl oder Rezeptorbindung erklärt werden kann [Cusi, K. et al., 2000; Wilden, P. A. et al., 1994]. Die Ergebnisse anderer Arbeiten legen nahe, dass die verminderte IR-

Tyrosinkinaseaktivität Folge der Hyperglykämie oder anderer Stoffwechselstörungen ist [Freidenberg, G. R. et al., 1988].

Ein physiologischer Anstieg der Plasmainsulinkonzentrationen stimuliert die Tyrosinphosphorylierung des IR und des IRS-1 um 150-200 % der Basalwerte bei schlanken, gesunden Individuen. Bei übergewichtigen Nichtdiabetikern ist die Insulin-induzierte Aktivierung dieser beiden frühen Schritte in der Insulinsignalkaskade eingeschränkt, während bei Typ-2-Diabetikern Insulin keinen signifikanten stimulierenden Effekt auf den IR oder auf IRS-1 ausübt. Die Assoziation der p85-Untereinheit der PI3-Kinase mit IRS-1 ist bei übergewichtigen Nichtdiabetikern und Patienten mit Typ-2-Diabetes verglichen mit schlanken, gesunden Kontrollpersonen deutlich reduziert. Die Assoziation der p85-Untereinheit der PI3-Kinase mit IRS-2 im Muskel kann durch Insulin ebenfalls nicht gesteigert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Typ-2-Diabetes mit einer Beeinträchtigung der Insulinsignalkaskade auf Ebene von IRS-1 und IRS-2 einhergehen kann [Cusi, K. et al., 2000; Krook, A. et al., 2000].

1.6 Phosphorylierung von IRS-1

Insulin entfaltet den Großteil seiner Wirkungen über die Insulin-Rezeptor-Substrate, von denen derzeit insgesamt sechs bekannt sind. IRS-1 ist das bis heute am besten untersuchte unter diesen [Sun, X. J. et al., 1991]. Nach Autophosphorylierung des IRs wird IRS-1 an zahlreichen Tyrosinen phosphoryliert und aktiviert so die Weiterleitung des Insulinsignals in der Zelle. Als Gegenregulationsmechanismus dazu unterliegt IRS-1 in der Folge jedoch neben der Tyrosinphosphorylierung auch Phosphorylierungen an verschiedenen Serin- und Threoninstellen. Für die Phosphorylierung an Serinen oder Threoninen von IRS-1 konnte gezeigt werden, dass sie zur Entwicklung der Insulinresistenz beitragen. Phosphorylierungen von Serinen und Threoninen können die Weiterleitung des intrazellulären Insulinsignals beeinträchtigen durch Hemmung der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1

[Hotamisligil, G. S. et al., 1996] oder durch eine Proteasom-abhängige IRS-1-Degradation. Faktoren, die Insulinresistenz auslösen können, wie etwa freie Fettsäuren [Gao, Z. et al., 2004], Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [Gao, Z. et al., 2003], Angiotensin II [Calegari, V. C. et al., 2005], Endothelin-I [Li, J. et al., 1999], zellulärer Stress [Ozcan, U. et al., 2004] oder chronische Insulinbehandlung [Cengel, K. A. et al., 1999], führen zu vermehrter Serin/Threonin-Phosphorylierung von IRS-1 und so zu einer Beeinträchtigung der Weiterleitung des Insulinsignals in der Zelle.

1.7 Serin 318-Phosphorylierung von IRS-1

In den vergangenen Jahren sind eine Reihe von Serinstellen beschrieben worden, deren Phosphorylierung die Interaktion zwischen dem IR und IRS-1 hemmt [Gual, P. et al., 2005]. Erst kürzlich konnte in einem zellfreien In-vitro-Assay und in Baby-Hamster-Nierenzellen, die den IR, IRS-1 und die Proteinkinase-C-Isoform- ζ (PKC- ζ) überexprimierten, mit Serin 318 (Ser318) eine neue Phosphorylierungsstelle identifiziert und charakterisiert werden, die nach Insulin-Stimulation durch die atypische PKC- ζ phosphoryliert wird [Moeschel, K. et al., 2004]. Die 12 strukturell und funktionell verwandten PKC-Isoformen sind Serin-/Threonin-Kinasen, die in drei Gruppen unterteilt werden. Von den klassischen (engl.: classical protein kinases; cPKC- α , - β_1 - β_2 und - γ) und den neuen (nPKC- δ , - ϵ , - η , und - θ) sind die atypischen (aPKC- ζ und - ι/λ) Isoformen zu unterscheiden. Letztere werden im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen nicht durch Phorbolster, wie beispielsweise 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat (TPA), aktiviert. Die hohe PKC-Aktivität in Insulin-abhängigen Geweben von Diabetikern, wie Leber und Muskel [Considine, R. V. et al., 1995; Avignon, A. et al., 1996], spiegelt die wichtige Bedeutung der PKCs für die Entwicklung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes wider [Idris, I. et al., 2001]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die PKC- ζ -abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 mit einer verminderten Bindung

zwischen dem IR und IRS-1 sowie mit einer abgeschwächten Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 einhergeht [Moeschel, K. et al., 2004]. Diese Ereignisse wirken sich negativ auf die Weiterleitung des intrazellulären Insulinsignals aus. Die Aktivierung von PKC- ζ findet bereits kurz nach der Stimulation mit Insulin statt und erreicht nach etwa zwei min ein erstes Maximum [Standaert, M. L. et al., 1999], während die Ser318-Phosphorylierung nach 60 min Insulinstimulation noch immer maximal hoch ist. Aus diesem Grunde galt es in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob es neben PKC- ζ andere Kinasen gibt, die IRS-1 vor allem nach lang anhaltender Insulin-Stimulation an Ser318 phosphorylieren können. Da der Skelettmuskel eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz spielt [Wallberg-Henriksson, H., 1992], wurde mit C2C12-Myotuben ein insulinempfindliches, nicht transfiziertes Zellsystem mit ausreichenden Mengen an endogenem IRS-1 gewählt. Darüber hinaus wurde der Einfluss weiterer physiologischer und pharmakologischer Stimuli, für die bekannt ist, dass sie zu Insulinresistenz führen können, wie etwa Glukose, freie Fettsäuren oder TNF- α auf die Ser318-Phosphorylierung von IRS-1 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agar-Agar	<i>Roth, Karlsruhe</i>
15-Desoxy-Prostaglandin J2 (15dPGJ2)	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
Ammoniumpersulfat	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Anisomycin	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Aprotinin	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Bisindolylmaleimid I	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Bovine serum albumin receptor grade	<i>Serva, Heidelberg</i>
Bovine serum albumin Fraktion V	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Cambrex, Verviers, BE</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Enhanced-chemiluminescence (ECL)-Reagenz	<i>Amersham, Buckinghamshire, GB</i>
Ethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Fötale Kälberserum (FCS)	<i>Cambrex Bioscience, Verviers, BE</i>
Fungizone	<i>Cambrex Bioscience, Verviers, BE</i>
Gelatine	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glutamin	<i>Cambrex Bioscience, Verviers, BE</i>
Glycerin	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Glycin	<i>Roth, Karlsruhe</i>
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-	
Ethansulfonsäure (HEPES)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Insulin Insuman Rapid 40 I.E./ml	<i>Aventis Pharma, Frankfurt a.M.</i>

Isopropanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Leucin	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Linoleat	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
LY294002	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Methanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Magnesiumdichlorid (MgCl ₂)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate; SDS)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Natriumfluorid (NaF)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Natriumpyrophosphat (Na ₂ P ₂ O ₇)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Palmitat	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Phosphate-bufferd saline (PBS)	<i>Cambrex, Verviers, BE</i>
PD98059	<i>Alexis Biochemical, Carlsbad, USA</i>
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	<i>Cambrex Bioscience, Verviers, BE</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
Phosphatidylinositol-(3,4)-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P ₂)	<i>Echelon, Salt Lake City, USA</i>
Ponceau S	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Rapamycin	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
SB20358	<i>Calbiochem, San Diego, USA</i>
SP600125	<i>Apotech, San Diego, USA</i>
Testlösung zur Proteinbestimmung	<i>Bio-Rad, München</i>
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat (TPA)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Trichloressigsäure	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>

Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
Trypsin	<i>Cambrex, Verviers, BE</i>
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	<i>TEBU, Offenbach</i>
Wortmannin	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>

2.1.2 Antikörper (AK)

- *Cell Signaling, Beverly, USA*
Polyklonaler Kaninchen-Akt-Phosphoserin 473-spezifischer-AK (# 9271)
Polyklonaler Kaninchen-c-Jun-Phosphoserin 73-spezifischer-AK (# 9164)
Polyklonaler Kaninchen-p70S6-Kinase-Phosphothreonin 389-spezifischer-AK (# 9205)
- *Upstate, Lake Placid, USA*
Polyklonaler Kaninchen-IRS-1-Antikörper (# 06-248)
- *Abcam, Cambridge, UK*
Polyklonaler N-terminaler Kaninchen-Shp2-AK (# ab9214)
- *Dieser Antikörper wurde uns freundlicherweise von Dr. M.F. White, Joslin Diabetes Center, Boston, MA, USA zur Verfügung gestellt:*
Polyklonaler Kaninchen-IRS1-Phosphoserin 307-spezifischer-Antikörper
- *Universität Tübingen, Laboratorien der Medizinischen Klinik, Abteilung IV*
Polyklonaler Kaninchen-IRS1-Phosphoserin 318-spezifischer-Antikörper
Monoklonaler Maus-IRS1-Antikörper 12H8
- *Sigma-Aldrich, Taufkirchen*
Sekundärantikörper anti-Maus, anti-Kaninchen und anti-Ziege
- *Merck (Calbiochem), Darmstadt*
JNK-Aktivitäts-Immunoassay (# 420115)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Auslauf-Pipetten (5, 10, 25 ml)	<i>Corning Inc., Corning, USA</i>
Einfrierröhrchen	<i>Nunc Roskilde, DK</i>
Einmalhandschuhe	<i>Kimberly-Clark, Roswell, USA</i>
Filterpapier	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>
Hyperfilm ECL	<i>Amersham, Buckinghamshire, GB</i>
Nitrocellulosemembranen	<i>Amersham, Buckinghamshire, GB</i>
Pipettenspitzen	<i>Peske, Aindling</i>
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße (15 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße (50 ml)	<i>Greiner Bio-one, Kremsmünster, A</i>
Zellkulturschalen (10 und 15 cm)	<i>TPP, Trasadingen, CH</i>
Glasflaschen mit Plastikdeckel	<i>Schott, Mainz</i>
Bechergläser	<i>Schott, Mainz</i>
Kunststoffküvetten	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Pasteur-Kapillarpipetten (150 mm)	<i>WU, Mainz</i>
Zellschaber	<i>Corning Inc., Corning, USA</i>
Filter (Porengröße 0,2 µm)	<i>Vivasciense, Hannover</i>
Spritzen (20 ml)	<i>Braun, Melsungen</i>
Kanülen (BD Microlance3)	<i>Becton Dickinson, Fraga, E</i>

2.1.4 Geräte

Blockthermostate	<i>Kleinfeld Labortechnik, Gehrden</i> <i>Störk-Tronic, Stuttgart</i>
Blotkammern	<i>H.Hölzel, Wörth</i>
Eismaschine Frimont (MF 30)	<i>Scotsman, Mailand, I</i>
Feinwaagen (PG2002 / AB104)	<i>Mettler Toledo, Giessen</i>
Fotometer (Genesys 5)	<i>Spectronic Inst., Rochester, USA</i>
Inkubationsschränke (function line)	<i>Heraeus, Osterode</i>
Kreis-Schüttler Vortex-Genie-2	<i>Scientific Ind., Bohemia, USA</i>
Magnetrührer (RCT basic)	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Mikroskop Axiovert 25	<i>Zeiss, Jena</i>
Netzgeräte	<i>Dr. L. Fischer, Heidelberg</i>
pH-Meter (pH 526)	<i>Techn. Werkstätten, Weilheim</i>
Pipetten (2,5 / 20 / 200 / 1000 µl)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pipettierhilfe (Pipet Aid XP)	<i>Drummond, Broomall, USA</i>
Standzentrifuge (Megafuge 2.0 R)	<i>Heraeus, Osterode</i>
Sterilbänke (Hera safe)	<i>Heraeus, Osterode</i>
Stickstoffbehälter (Chronos Biosafe)	<i>Messer, Griesheim</i>
Tiefkühlgeräte	<i>Heraeus, Osterode</i> <i>Liebherr, Biberach a.d Riss</i>
Tisch-Zentrifugen Biofuge pico / fresco	<i>Heraeus, Osterode</i>
Wasserbäder	<i>Julabo, Seelbach</i> <i>GFL, Burgwedel</i>
Wasseraufbereitungsgerät	<i>Millipore, Billerica, USA</i>
Wipp-Schüttler Rocky	<i>LTF Labortechnik, Wasserburg</i>

2.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

- Zell-Lysepuffer
50 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 10 % Glycerin; 1 % Triton X-100; Protease-Phosphatase-Inhibitor-Mix aus 1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin; 100 mM NaF; 10 mM Na₄P₂O₇; 2 mM Na₃VO₄
- 5-fach-konzentrierte Laemmlilösung
125 mM TRIS (pH 8,8); 10 % Glycerin; 4 % SDS; 10 % β-Mercaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau
- Elektrophorese-Laufpuffer
250 mM TRIS; 2,5 M Glycin; 1 % SDS
- Transfer-Puffer
48 mM TRIS; 39 mM Glycin; 0,004 % SDS; 20 % Methanol
- Gelatine-haltiger Puffer
50 mM TRIS (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05 % Triton-X-100; 0,25 % Gelatine
- Ponceau S
0,2 % Ponceau S, 3 % Trichloressigsäure
- Lower TRIS
1,5 M TRIS (pH 6,8); 2 % SDS
- Upper TRIS
0,5 M TRIS (pH 8,8); 2 % SDS

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die embryonalen Mausfibroblasten (MEF, engl.: mouse embryonic fibroblasts) wurden bis zu vollständiger Konfluenz in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 1,0 g/l Glukose), versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (engl.: fetal calf serum; FCS) und 2 mM Glutamin kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen - entsprechend des Versuchsaufbaus - mit 100 nM TPA oder 100 nM Insulin behandelt.

Die C2C12-Myoblasten wurden in DMEM (4,5 g/l Glukose), versetzt mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 0,2 % Penicillin-Streptomycin (PenStrep) und 5 µg/ml Fungizone, kultiviert. Nach Erreichen der 80%-igen Konfluenz (**Abb. 2 (A)**) wurden die Zellen in DMEM (4,5 g/l Glukose), versetzt mit 0,5 % FCS, 2 mM Glutamin, 0,2 % PenStrep und 5 µg/ml Fungizone, überführt und dort bei dreimaligem Mediumwechsel für 9 Tage zu Myotuben differenziert (**Abb. 2 (B)**). Schließlich wurden die Zellen vor der Stimulation für 24 Stunden in DMEM (1 g/l Glukose), versetzt mit 0,5 % FCS, 2 mM Glutamin, 0,2 % PenStrep und 5 µg/ml Fungizone, inkubiert.

Abb. 2 (A)

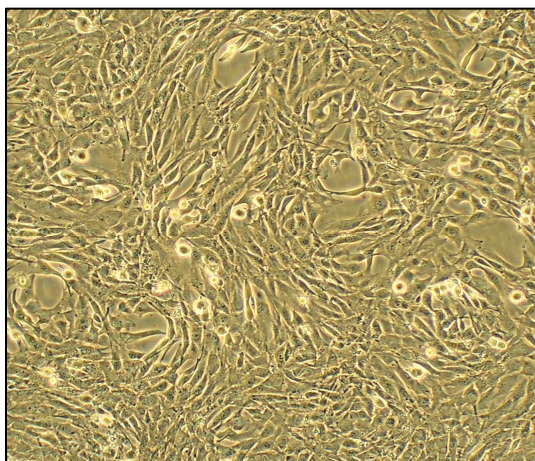


Abb. 2 (B)

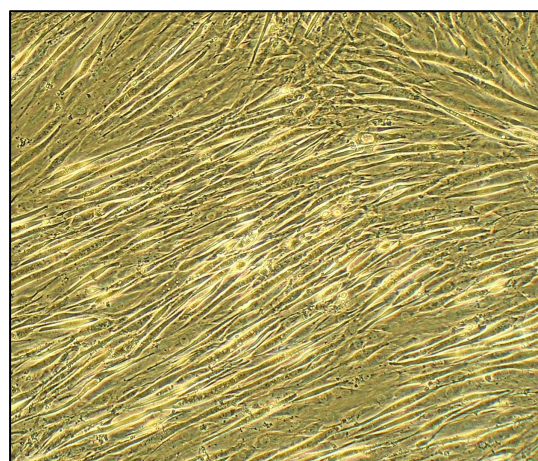


Abb. 2: Zellkultur von C2C12-Myotuben. *Zellen im Wachstum bei ca. 80%-Konfluenz (A) und nach vollständiger Differenzierung nach 9 Tagen (B)*

Im Anschluß wurden die Zellen dann - entsprechend des Versuchsaufbaus - bei 37°C mit 10-1000 nM TPA oder 10-1000 nM Insulin für 1-60 min sowie mit 5 nM TNF- α , 25 mM Glukose, 1 mM Linoleat, 1 mM Palmitat, 25 μ g/ml Anisomycin oder 5 mM Leucin für jeweils 30 min stimuliert. Bei einigen Experimenten wurden die Zellen vor der Stimulation für jeweils 30 min bei 37°C mit 50 μ M c-Jun-N-terminale-Kinase (JNK)-Inhibitor SP600125, 1 μ M p38-Mitogen-aktivierte-Protein (MAP)-Kinase-Inhibitor SB203580, 20 μ M MAP-Kinase/extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) (MEK)-1-Inhibitor PD98059, 500 nM PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIS), 15 μ M I κ B-Kinase- β (IKK- β)-Inhibitor 15dPGJ2, 100 nM PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin, 10 μ M PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 oder 25 nM mammalian-target-of-rapamycin (mTOR)-Inhibitor Rapamycin vorinkubiert.

2.2.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die zuvor - entsprechend des Versuchsaufbaus - behandelten Zellen nach Abschluss der Inkubation einmal mit gekühltem Phosphat-Natriumchlorid-Puffer (engl.: phosphate buffered saline; PBS) gewaschen. Nach Zugabe von 500 μ l Lysepuffer pro 10 cm-Schale wurden die Zellen mittels eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale gelöst, in Reaktionsgefäße überführt und anschließend sogleich auf Eis gestellt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Reaktionsgefäße bei 13.000 rpm und 4°C für 7 min zentrifugiert. Der die zytosolischen Proteine enthaltende Überstand wurde abgenommen und in ein neues gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, welches Kerne und Membrantrümmer enthielt, wurde verworfen.

2.2.3 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, M. M., 1976] wurden 10 µl Zelllysate ad 100 µl mit zweifach destilliertem Wasser (H₂O_{dd}) verdünnt und zur Doppelbestimmung der einzelnen Proben jeweils 25 µl der Verdünnung in zwei Reaktionsgefäße überführt. Diese 25 µl wurden jeweils mit 1250 µl einer 1:5 mit H₂O_{dd} verdünnten Testlösung zur Proteinbestimmung von Bio-Rad vermischt und die Extinktion der Farblösung nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei einer Emission von 595 nm im Photometer gemessen. Zur Quantifizierung der ermittelten Extinktion wurde parallel zur Messung der Proben eine Eichkurve mit einem Bovine serum albumin (BSA)-Standard (100 µg/ml in H₂O_{dd}) im Bereich von 0,25 bis 1,0 µg/µl erstellt sowie ein Leerwert ohne Protein gemessen. Anschließend wurde aus den beiden Proben eines jeden Zelllysates der Mittelwert bestimmt und - unter Berücksichtigung der Eichkurve - das erforderliche Volumen errechnet, das später auf das Gel aufgetragen werden sollte.

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung der zytoplasmatischen Proteine in einem 7,5%-igen Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate, SDS)-Polyacrylamid-Gel (vgl. **Tabelle 1**) wurden die Proben mit 5-fach-konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 100 °C inkubiert. Die Glasplatten der Gelkammer wurden mit Ethanol gereinigt, um sie von Fett zu befreien. In einem Becherglas wurden die Bestandteile des zu gießenden Trenngels - gemäß der **Tabelle 1** - gemischt. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) wurde die Acrylamid-Lösung zügig in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten gegossen. Um zu verhindern, dass Sauerstoff in das Gel diffundieren und so die Polymerisation behindern konnte, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach Abschluß der Polymerisation, die in vertikaler Position und bei Raumtemperatur erfolgte, wurde das Isopropanol abgegossen. Der obere Rand des Gels wurde mehrere

Male mit destilliertem Wasser (H₂O_d) abgespült, um nichtpolymerisiertes Acrylamid zu entfernen, und mit einem Papierhandtuch getrocknet. Anschließend wurde die Sammelgel-Lösung - gemäß **Tabelle 1** - in einem Becherglas hergestellt und nach Zugabe von APS zügig zwischen die Glasplatten auf das polymerisierte Trenngel gegossen.

Nach dem Gießen des Sammelgels wurde sofort ein Kamm eingesetzt, um die einzelnen Geltaschen für die Proben abzutrennen. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und das Gel mit den Proben in den zuvor errechneten Volumina in den einzelnen Geltaschen beladen.

Gleiche Proteinmengen (100 µg Gesamtprotein/Geltasche) wurden für 12-16 h bei 10-12 mA aufgetrennt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden dabei in einer Spur des Gels 30 µl Proteinmarker mit Laufgewichten (scheinbaren Molekulargewichten) von 31 kD bis 200 kD aufgetragen.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Trenngel 7,5 %		Sammelgel 3,9 %	
Polyacrylamid	10 ml	Polyacrylamid	1,8 ml
H ₂ O	20 ml	H ₂ O	9,4 ml
Lower TRIS	10 ml	Upper TRIS	3,5 ml
TEMED	66 µl	TEMED	15 µl
APS	270 µl	APS	150 µl

2.2.5 Western-Blotting

Für den Nachweis und die Semiquantifizierung der zu untersuchenden Proteine wurden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine in einer Transferkammer auf Nitrocellulose überführt. Für dieses Verfahren wurden die

Filterpapiere bzw. die Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, in Transfer-Puffer getränkt und anschließend in folgender Reihenfolge von unten nach oben in der Transferkammer positioniert: 3 Filterpapiere, Nitrocellulosemembran, Gel, 3 Filterpapiere. Nach jeder Schicht wurden Luftblasen vorsichtig durch Rollen einer Kunststoffpipette von der Mitte nach außen ausgestrichen. Der Transfer erfolgte bei 12 mA pro Gel für 3-4 h bei 4°C.

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran für 5 min in Ponceau S-Lösung inkubiert. Nach dem Abspülen des ungebundenen Farbstoffes mit H₂O_d wurden die Markerproteine angezeichnet. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Gelatine-haltigem Puffer bei mehrfachem Wechsel inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Über Nacht wurde die Membran bei 4°C in der spezifischen Antikörperlösung geschüttelt und am nächsten Morgen für dreimal 10 min in Gelatine-haltigem Puffer gewaschen. Zur Detektion der gebundenen spezifischen Primärantikörper wurde anschließend für 1,5 h bei Raumtemperatur ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper zugegeben. Nach erneutem Waschen in Gelatine-haltigem Puffer für dreimal 10 min wurde die Enhanced-chemiluminescence (ECL)-Detektionslösung (frisch hergestellt aus gleichen Mengen von Lösung A und B) zugegeben. Die bei der ablaufenden Reaktion zwischen Meerrettich-Peroxidase und ECL entstandene Lichtenergie wurde durch Auflegen eines Hyperfilm ECL sichtbar gemacht. Hierzu wurden je nach Strahlungsintensität Expositionszeiten zwischen 10 s und 50 min gewählt. Nach Ablauf der Expositionszeiten wurden die Membranen in der Dunkelkammer wieder vom Hyperfilm ECL abgenommen und der Film entwickelt.

2.2.6 JNK-Aktivitäts-Immunoassay

Der JNK-Aktivitäts-Immunoassay wurde entsprechend des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokolls durchgeführt. JNK wurde dabei aus Zelllysaten von C2C12-Zellen immunopräzipitiert und anschließend die Kinase-Reaktion

durch Zugabe von c-Jun-Protein und einem Adenosintriphosphat (ATP)-Mix gestartet. Die Proben wurden für 25 min bei 30 °C inkubiert, die Proteine wie bereits beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blotting unter Verwendung eines phosphospezifischen c-Jun-Antikörpers nachgewiesen.

2.2.7 Densitometrie und statistische Analyse

Zur Quantifizierung der Signalintensität der Immunoblot-Banden wurde die EasyWin32 Herolab Software verwendet. Die densitometrischen Daten der phosphospezifischen Signale wurden dabei auf die entsprechenden densitometrischen Werte der Proteinexpression bezogen. Zur Berechnung von Mittelwerten und Fehlerindikatoren wurden hierzu die Ergebnisse von mindestens fünf unabhängigen Experimenten herangezogen. Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden wurde der ungepaarte Student-t-Test verwendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Die TPA- und Insulin-abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318

In C2C12-Myotuben führte die 30-minütige Stimulation mit TPA (100 nM) und Insulin (100 nM) zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 (**Abb. 3**). Nach Insulin-Behandlung kam es infolge der Phosphorylierung anderer Serine und Threonine zu einer deutlichen Verschiebung der IRS-1-Bande hin zu einem höheren Molekulargewicht. Ein weniger deutlicher Anstieg war nach Stimulation mit TNF- α (5 nM, 30 min) zu beobachten. Die Stimulation mit Glukose (25 nM), Linoleat (1 mM) oder Palmitat (1 mM) führte hingegen zu keiner Zunahme der Phosphorylierung.

Abb. 3

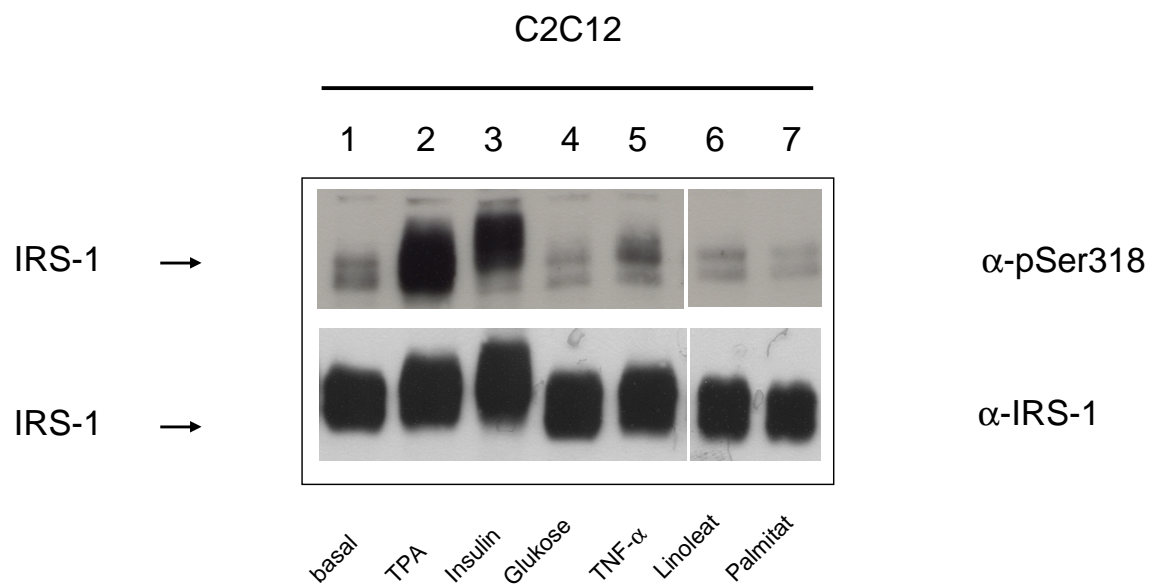


Abb. 3: Insulin und TPA induzieren eine Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318. C2C12 Myotuben wurden für jeweils 30 min mit 100 nM TPA, 100 nM Insulin, 25 mM Glukose, 5 nM TNF- α , 1 mM Linoleat und 1 mM Palmitat behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und IRS-1 mittels Western-Blotting detektiert.

Da TPA und Insulin sich als stärkste Stimuli für die Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 zeigten, wurden verschiedene Konzentrationen von TPA und Insulin untersucht. Die Behandlung mit 100 nM TPA und 100 nM Insulin führte zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318, welche mit einer Konzentrationserhöhung auf 1000 nM TPA bzw. Insulin nicht weiter gesteigert werden konnte (**Abb. 4**).

Abb. 4

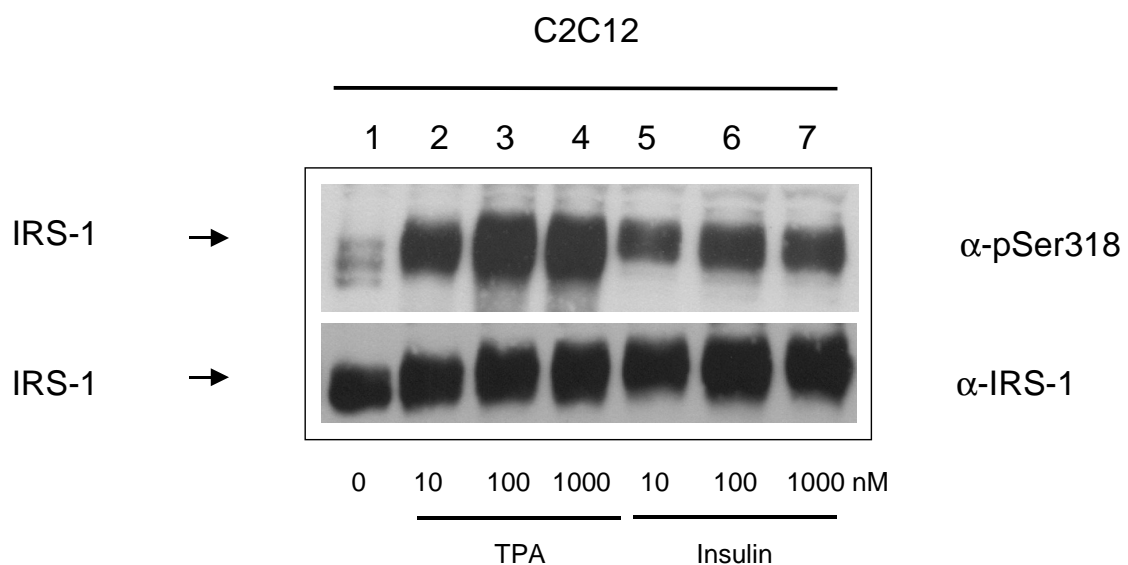


Abb. 4: Konzentrationsreihen der TPA- und Insulin-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit ansteigenden Konzentrationen von 0-1000 nM behandelt.

Darüber hinaus wurden Zeitreihen-Versuche mit 100 nM TPA (**Abb. 5 (A)**) bzw. Insulin (**Abb. 5 (B)**) durchgeführt. Hier zeigte sich für TPA bereits nach 1 min eine starke Ser318-Phosphorylierung. Ein Maximum wurde nach 30 min erreicht. Durch Verlängerung der Inkubationszeit über 30 min hinaus kam es zu keinem weiteren Anstieg der Phosphorylierung. Für Insulin wurde hingegen erst nach 15 min eine starke Zunahme der Ser318-Phosphorylierung beobachtet. Ein Maximum wurde ebenfalls nach 30 min erreicht. Durch Verlängerung der Inkubationszeit über 30 min hinaus kam es auch hier zu keinem weiteren Anstieg. Aus diesem Grunde wurde in den darauf folgenden Versuchen die Ser318-Phosphorylierung nach 30-minütiger Inkubation mit TPA und Insulin jeweils in einer Konzentration von 100 nM untersucht.

Abb. 5 (A)

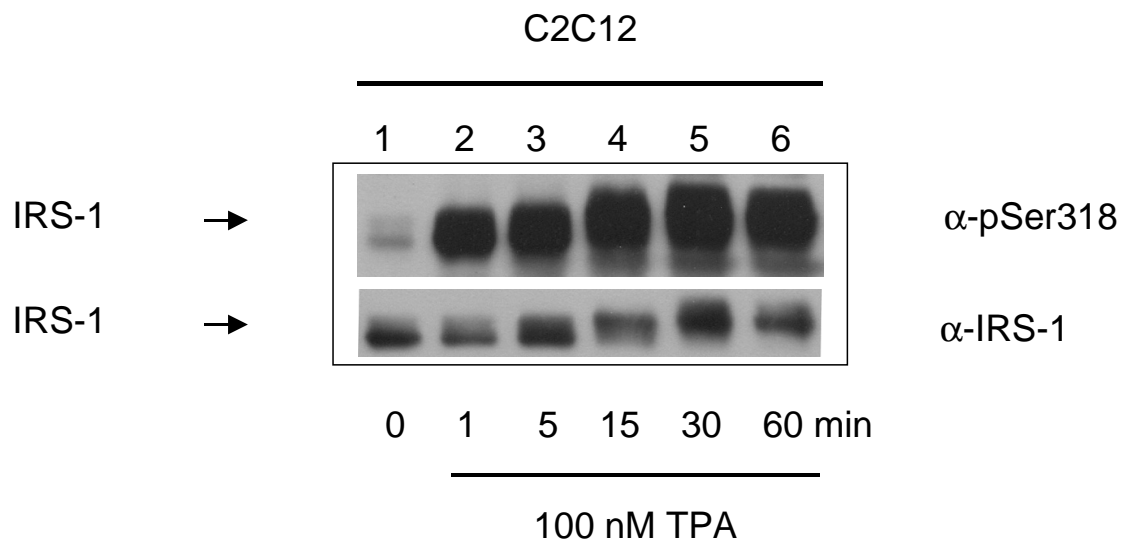


Abb. 5 (B)

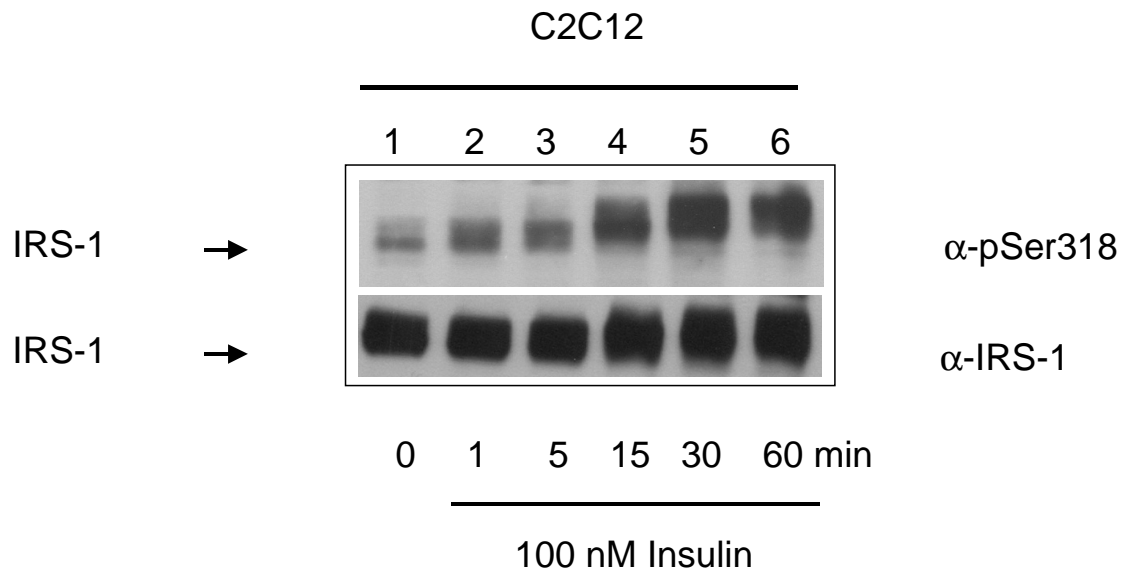


Abb. 5: Zeitreihe TPA- bzw. Insulin-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318. C2C12-Myotuben wurden 0-60 min mit jeweils 100 nM TPA (**A**) bzw. Insulin (**B**) behandelt.

Durch 30-minütige Vorinkubation mit dem PKC-Inhibitor BIS (500 nM), konnte die Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 nach 30-minütiger Stimulation mit 100 nM TPA deutlich abgeschwächt (**Abb. 6 (A)**) und nach 30-minütiger Stimulation mit 1 und 10 nM TPA auf das basale Niveau reduziert werden (**Abb. 6 (B)**). Diese Ergebnisse belegen die Beteiligung von klassischen und/oder neuen PKC-Isoformen an der TPA-stimulierten IRS-1 Ser318-Phosphorylierung. Die Beobachtung, dass die Phosphorylierung nach Stimulation mit 100 nM TPA durch die Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor nicht vollständig abgeschwächt wurde, könnte daraufhindeuten, dass neben PKCs auch andere Kinasen unspezifisch aktiviert werden.

Im Gegensatz dazu hatte eine Vorinkubation mit BIS auf die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung keine Auswirkung (**Abb. 6 (C)**). Klassische oder neue PKC-Isoformen scheinen für diese Phosphorylierung also keine Rolle zu spielen.

Abb. 6 (A)

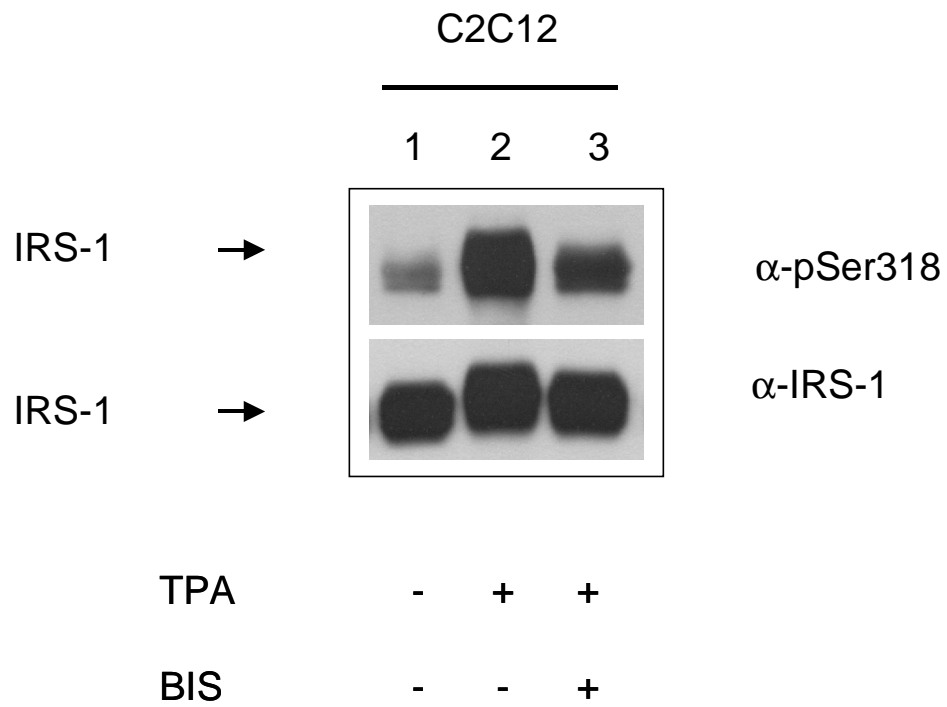


Abb. 6 (B)

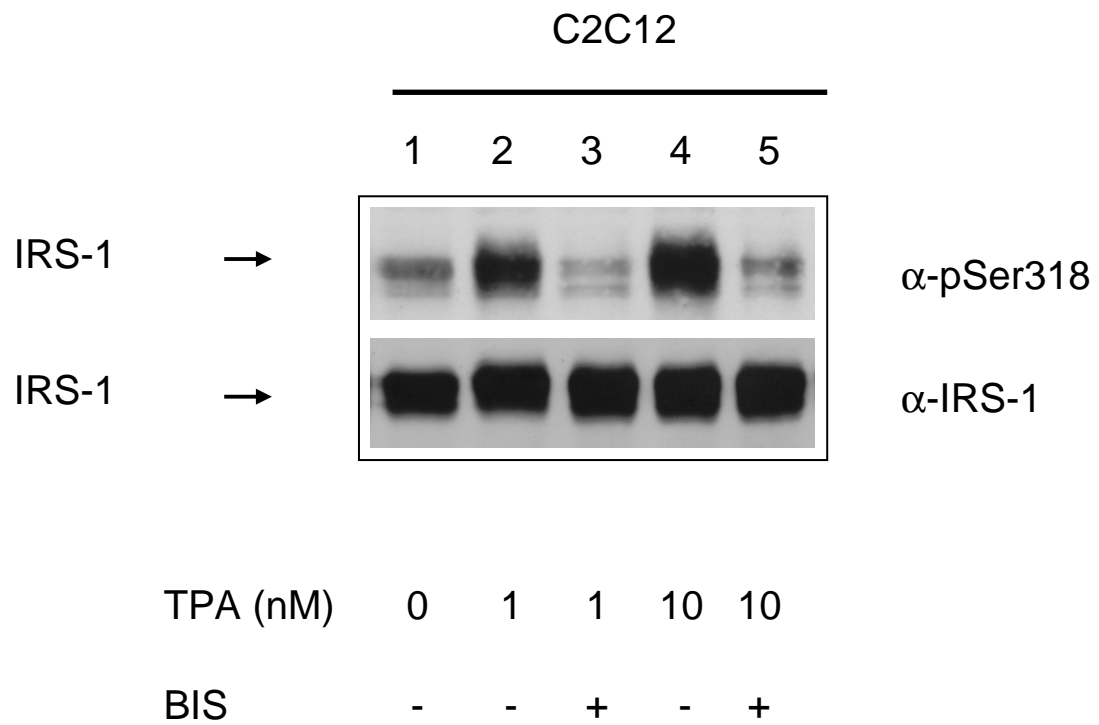


Abb. 6 (C)

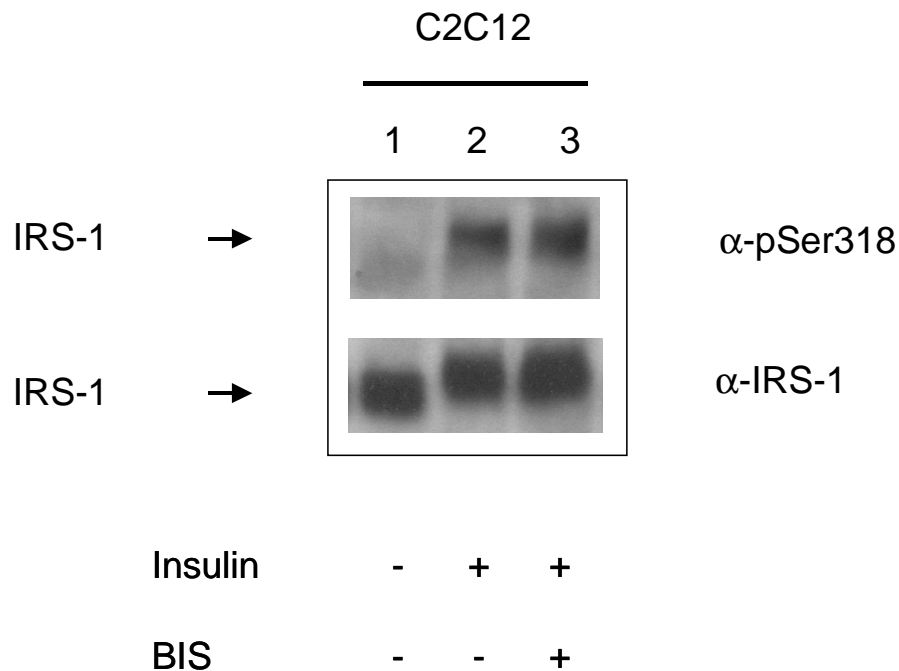


Abb. 6: Die TPA-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 ist zumindest teilweise durch klassische und/oder neue PKC-Isoformen vermittelt, die Insulin-induzierte Phosphorylierung an Ser318 jedoch nicht. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit 100 nM TPA (A), 1 und 10 nM TPA (B) sowie mit 100 nM Insulin (C) behandelt mit oder ohne Vorinkubation mit dem PKC-Inhibitor BIS (500 nM, 30 min).

3.2 Die Rolle der Shp2 bei der Phorbol ester-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318

Nachdem kürzlich gezeigt konnten, dass die PKC-abhängige Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 (Ser307) abhängig von der SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-2 (Shp2) ist [Mussig, K. et al., 2005], galt es zu prüfen, ob die Phorbol ester-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 ebenfalls Shp2-abhängig reguliert wird. Dazu bedienten wir uns des Zellmodells der Shp2-Knockout-MEF (Shp2^{-/-}), die keine Shp2 exprimierten, und solcher MEF-Zellen, die mit humaner Shp2 stabil transfiziert worden waren (Shp2 wt). Die Inkubation mit 100 nM TPA führte sowohl in den Shp2-exprimierenden

Zellen als auch in den $Shp2^{-/-}$ -Zellen bereits nach 10 min zu einer deutlichen Phosphorylierung von Ser318, die auch nach 120 min noch nachzuweisen war (**Abb. 7**). Auch in einer statistischen Auswertung von insgesamt 17 unabhängigen Experimenten zeigte sich keine $Shp2$ -Abhängigkeit der TPA-induzierten IRS-1-Phosphorylierung an Ser318. Im Gegensatz zur Ser307-Phosphorylierung scheint also die TPA-induzierte IRS-1-Ser318-Phosphorylierung von $Shp2$ unabhängig zu sein.

Abb. 7

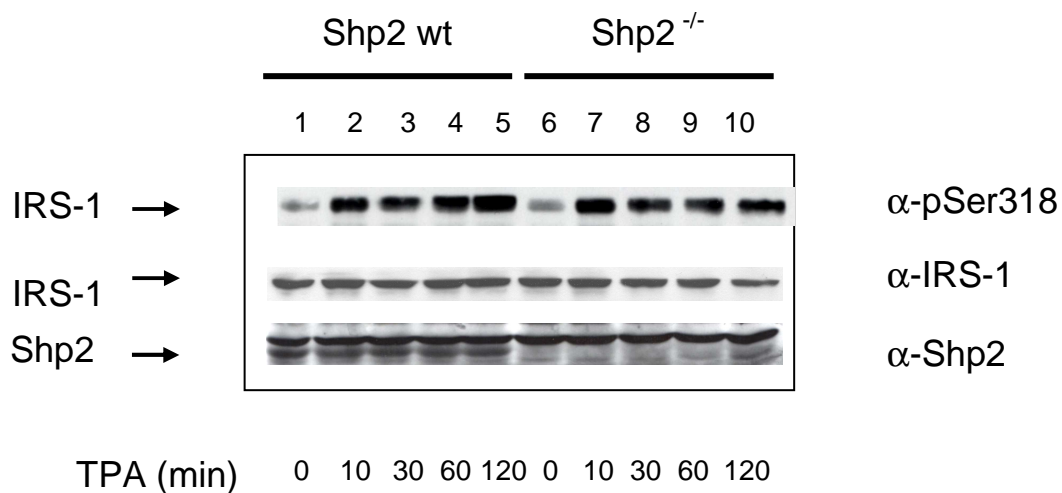


Abb. 7: Die TPA-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 ist nicht $Shp2$ -abhängig. MEF-Zellen, die mit humaner $Shp2$ stabil transfiziert wurden ($Shp2$ wt), und MEF-Zellen, die keine $Shp2$ exprimierten ($Shp2^{-/-}$) wurden für 0-120 min mit jeweils 100 nM TPA behandelt.

3.3 Die Rolle von JNK und PI3-Kinase/mTOR bei der Insulin-induzierten IRS-1-Ser318-Phosphorylierung

Für verschiedene Kinasen, wie etwa JNK [Aguirre, V. et al., 2000], ERK2 [De Fea, K. et al., 1997], IKK- β [Gao, Z. et al., 2002] oder mTOR [Ozes, O. N. et al., 2001] ist beschrieben, dass sie IRS-1 phosphorylieren können. Aus diesem Grund untersuchten wir eine Beteiligung dieser und anderer Kinasen an der

TPA- und Insulin-induzierten Ser318-Phosphorylierung, indem wir jeweils spezifische Inhibitoren der einzelnen Kinasen einsetzten.

Die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung in C2C12-Myotuben konnte durch Vorinkubation mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (50 μ M) deutlich, aber nicht vollständig abgeschwächt werden. Mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin (25 nM) oder dem PI3-Kinase-Inhibitor LY 294002 (10 μ M) konnte hingegen eine vollständige Abschwächung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu hatte die Vorinkubation mit dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 (1 μ M), dem MEK-1-Inhibitor PD098059 (20 μ M) oder dem IKK- β -Inhibitor 15-Desoxy-Prostaglandin J2 (15dPGJ2; 15 μ M) keinen Einfluss auf die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung (**Abb. 8 (A)**).

Wurden die C2C12-Myotuben zusätzlich zu SP600125 mit Rapamycin oder LY294002 vorbehandelt, konnte das Signal der Phosphorylierung an Ser318 signifikant bis auf Basalniveau abgesenkt werden (Student-t-Test; n=5; p=0,0340 bzw. p=0,0126). Die kombinierte Vorinkubation mit SP600125, Rapamycin und LY294002 führte sogar zu einer signifikant unter dem Basalniveau liegenden Ser318-Phosphorylierung (Student-t-Test; n=5; p=0,0275; **Abb. 8 (B)** und **(C)**). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass diese Kinasen auch an der Insulin-unabhängigen basalen Ser318-Phosphorylierung beteiligt sein könnten.

Unsere Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der JNK sowie des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges, nicht jedoch der p38-MAP-Kinase, MEK-1 oder IKK- β bei der Insulin-induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 hin.

Abb. 8 (A)

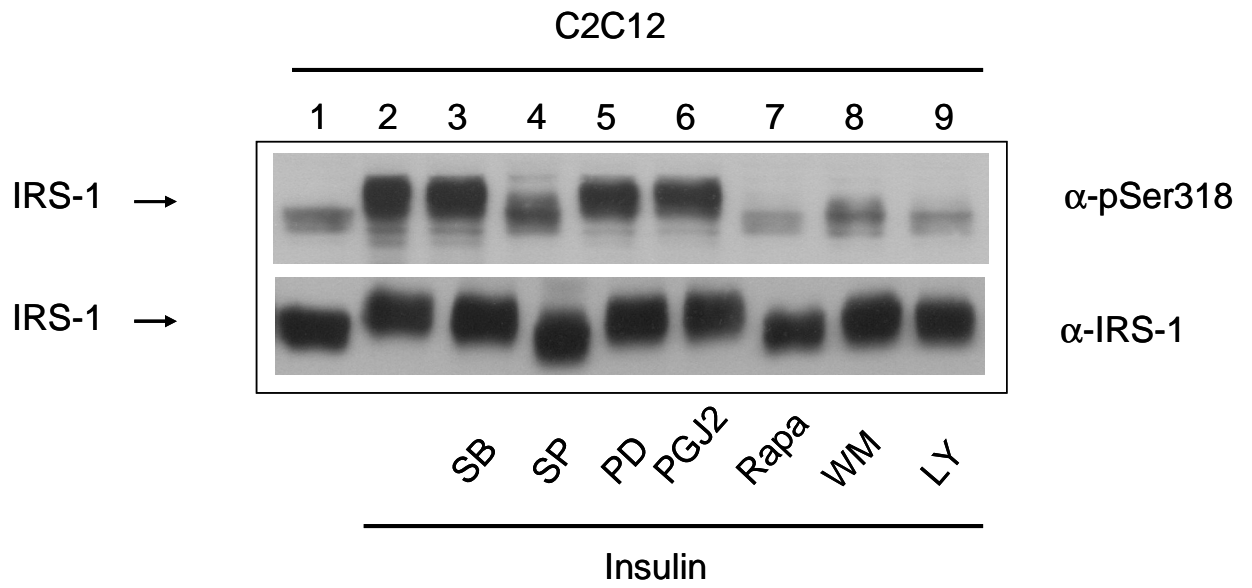


Abb. 8 (B)

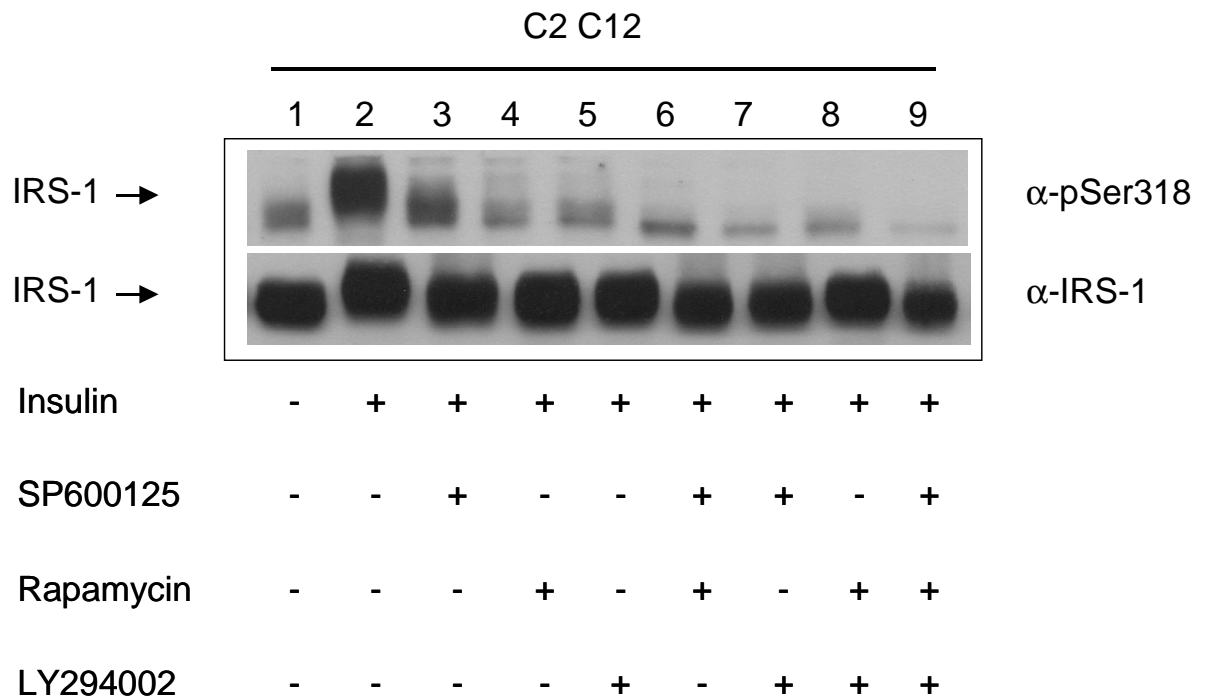


Abb. 8 (C)

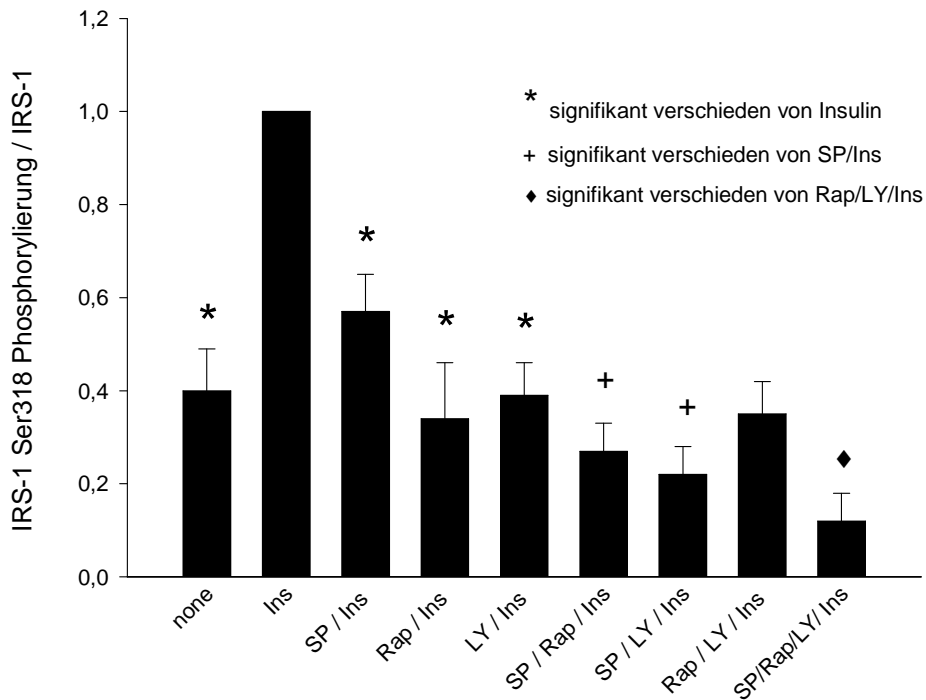


Abb. 8: JNK und der PI3-Kinase/mTOR-Weg vermitteln die Insulin-induzierte IRS-1-Ser318-Phosphorylierung. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit 100 nM Insulin mit oder ohne Vorinkubation (30 min) mit 1 μ M p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 (SB), 50 μ M JNK-Inhibitor SP600125 (SP), 20 μ M MEK-1-Inhibitor PD098059 (PD), 15 μ M IKK- β -Inhibitor 15dPGJ2 (PGJ2), 25 nM mTOR-Inhibitor Rapamycin (Rapa), 100 nM PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (WM) und 10 μ M PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 (LY) inkubiert **(A)**. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit 100 nM Insulin mit oder ohne Vorinkubation (30 min) mit 50 μ M JNK-Inhibitor SP600125, 25 nM mTOR-Inhibitor Rapamycin, 10 μ M PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 sowie mit Kombinationen dieser Inhibitoren behandelt. **(B)** zeigt einen repräsentativen Immunoblot, **(C)** die Ergebnisse einer densitometrischen Auswertung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten ($n \geq 5$). Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$, ungepaarter Student-t-Test) wurden markiert.

Die TPA-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 hingegen wurde durch Vorinkubation mit dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB203580, JNK-Inhibitor SP600125, MEK-1-Inhibitor PD098059, IKK- β -Inhibitor 15dPGJ2, mTOR-Inhibitor Rapamycin oder den PI3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin (100 nM) und LY294002 nicht signifikant beeinflusst (**Abb. 9**). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass diese Kinasen bei der Phorbol ester-induzierten Ser318-Phosphorylierung keine Rolle spielen.

Abb. 9

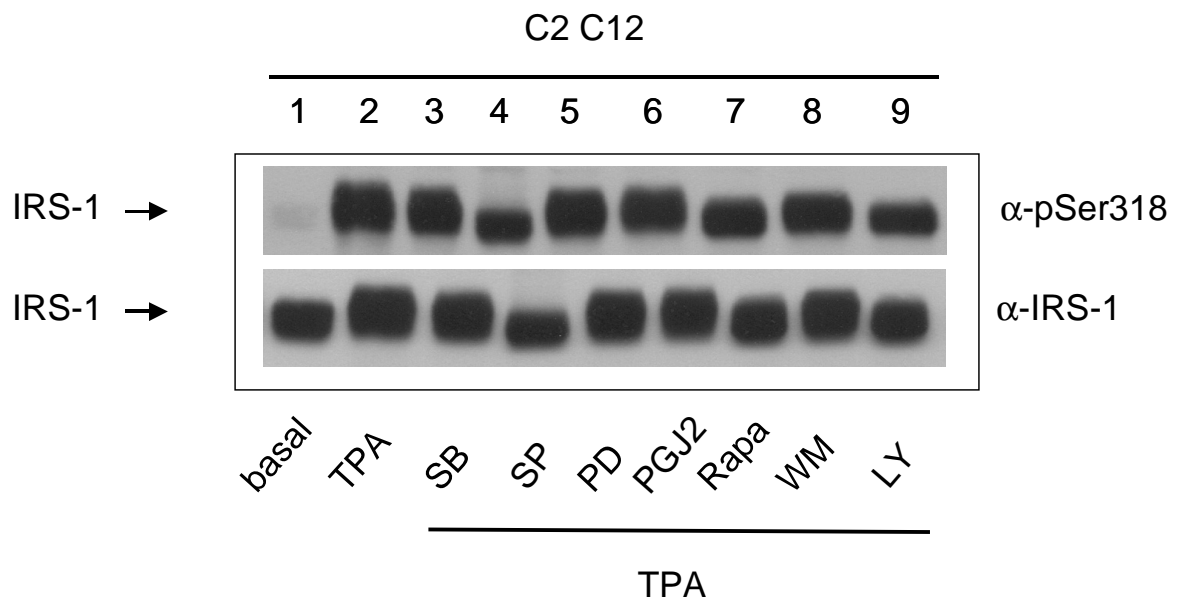


Abb. 9: JNK und der PI3-Kinase/mTOR-Weg vermitteln die TPA-induzierte IRS-1-Ser318-Phosphorylierung nicht. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit 100 nM TPA mit oder ohne Vorinkubation (30 min) mit 1 μ M p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 (SB), 50 μ M JNK-Inhibitor SP600125 (SP), 20 μ M MEK-1-Inhibitor PD098059 (PD), 15 μ M IKK- β -Inhibitor 15dPGJ2 (PGJ2), 25 nM mTOR-Inhibitor Rapamycin (Rapa), 100 nM PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (WM) und 10 μ M PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 (LY) inkubiert.

3.4 Aktivierung der JNK und des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges führt zur Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318

Der JNK-Aktivitäts-Immunoassay zeigte eine Insulin-induzierte Phosphorylierung von c-Jun, die durch Vorinkubation mit SP600125 wieder auf Basalniveau abgesenkt werden konnte (**Abb. 10 (A)**). Die Insulin-Stimulation führte ebenfalls zu einer verstärkten Phosphorylierung der PI3-Kinase- und mTOR-Substrate Akt (Proteinkinase B) bzw. p70S6-Kinase (p70S6K), die nach Vorinkubation mit LY294002 bzw. Rapamycin deutlich abnahm. (**Abb. 10 (B)** bzw. **(C)**)

Unsere Ergebnisse bestätigen also, dass PI3-Kinase, mTOR und JNK auch in unserem Zellsystem der C2C12-Myotuben durch Stimulation mit Insulin aktiviert werden.

Abb. 10 (A)

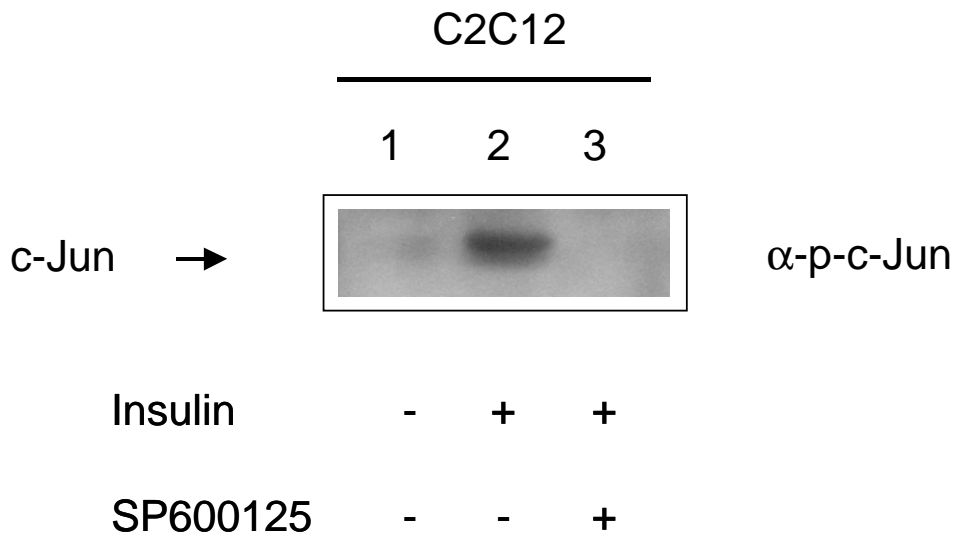


Abb. 10 (B)

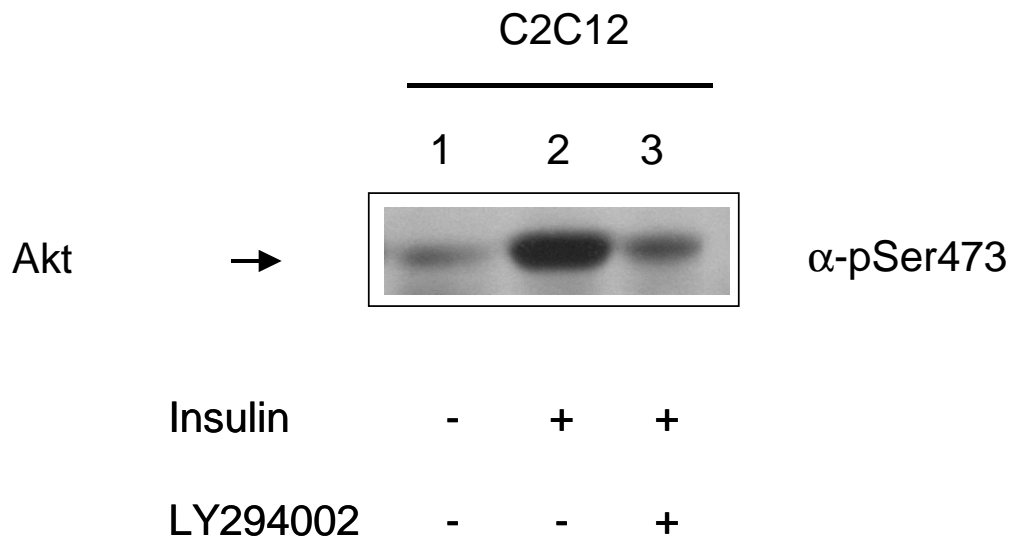


Abb. 10 (C)

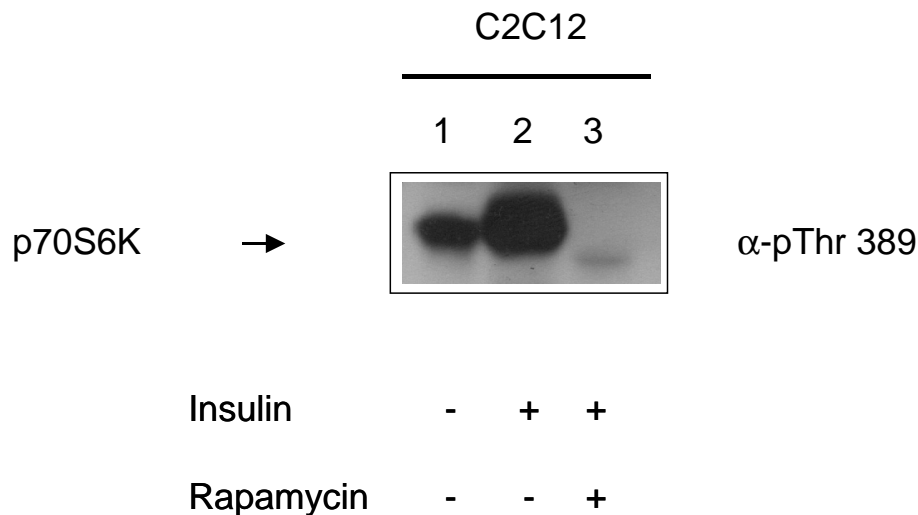


Abb. 10: JNK, PI3-Kinase und mTOR werden durch Insulinstimulation aktiviert. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit 100 nM Insulin mit oder ohne Vorinkubation (30 min) mit 50 µM JNK-Inhibitor SP600125, 25 nM mTOR-Inhibitor Rapamycin, 10 µM PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 behandelt. (A) Die JNK-Aktivität wurde mit Hilfe eines JNK-Aktivitäts-Immunoassays bestimmt. JNK wurde aus C2C12-Zelllysaten immunopräzipitiert und die Kinasereaktion durch Zugabe von rekombinantem c-Jun Protein und einem ATP-Mix gestartet (siehe auch „Material und Methoden“). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE

aufgetrennt und durch Western-Blotting mit Hilfe eines c-Jun-phosphospezifischen Antikörpers detektiert **(B)** und **(C)**. Die Aktivität von PI3-Kinase bzw. mTOR wurde mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper des jeweiligen Substrats Akt bzw. p70S6K analysiert.

Insulin-unabhängig konnte durch Stimulation mit dem JNK-Aktivator Anisomycin (25 µg/ml), dem mTOR-Aktivator Leucin (5 mM) und dem Produkt der PI3-Kinase Phosphatidylinositol-(3,4)-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P₂, 10µM) eine verstärkte Ser318-Phosphorylierung beobachtet werden, die nach Vorinkubation der Zellen mit den jeweils spezifischen Inhibitoren SP600125 bzw. Rapamycin wieder auf Basalniveau abgesenkt werden konnte (**Abb. 11 (A), (B) und (C)**).

Diese Beobachtung bestätigt, dass die Aktivierung von JNK und des PI3-Kinase-Signalweges tatsächlich zu vermehrter IRS-1-Phosphorylierung an Ser318 führt.

Abb. 11 (A)

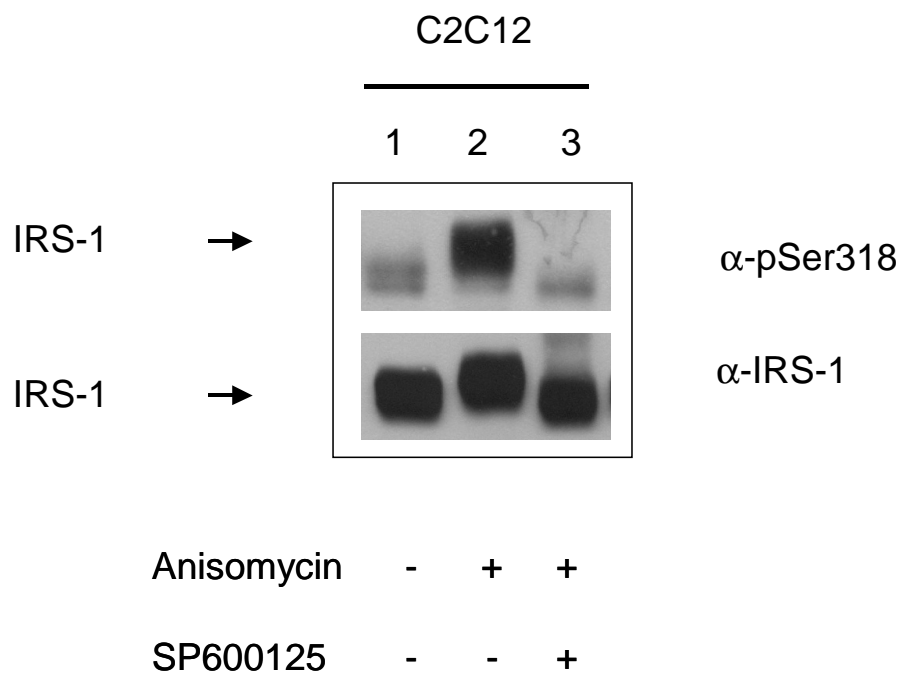


Abb. 11 (B)

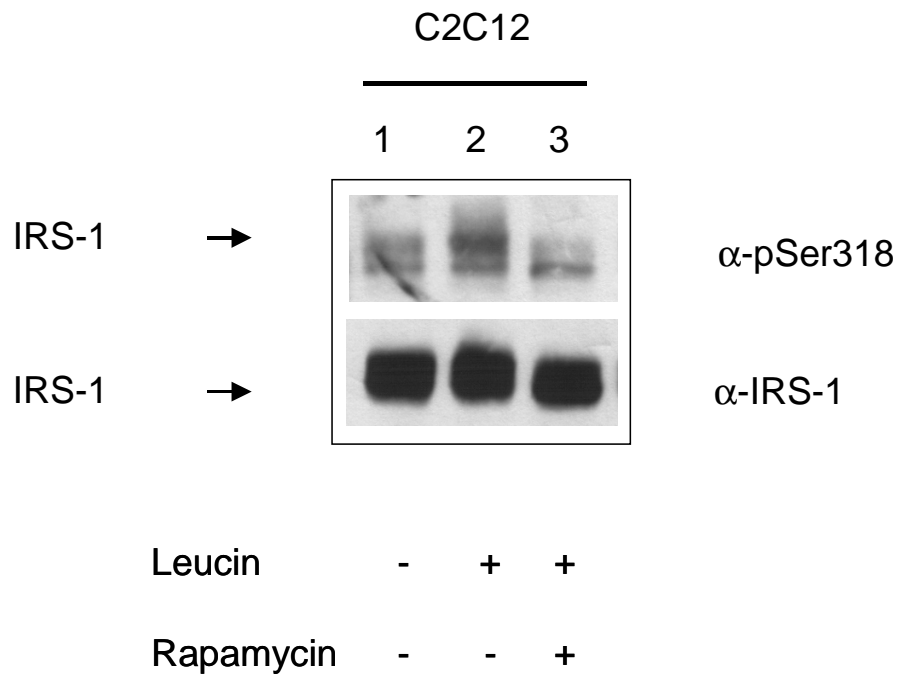


Abb. 11 (C)

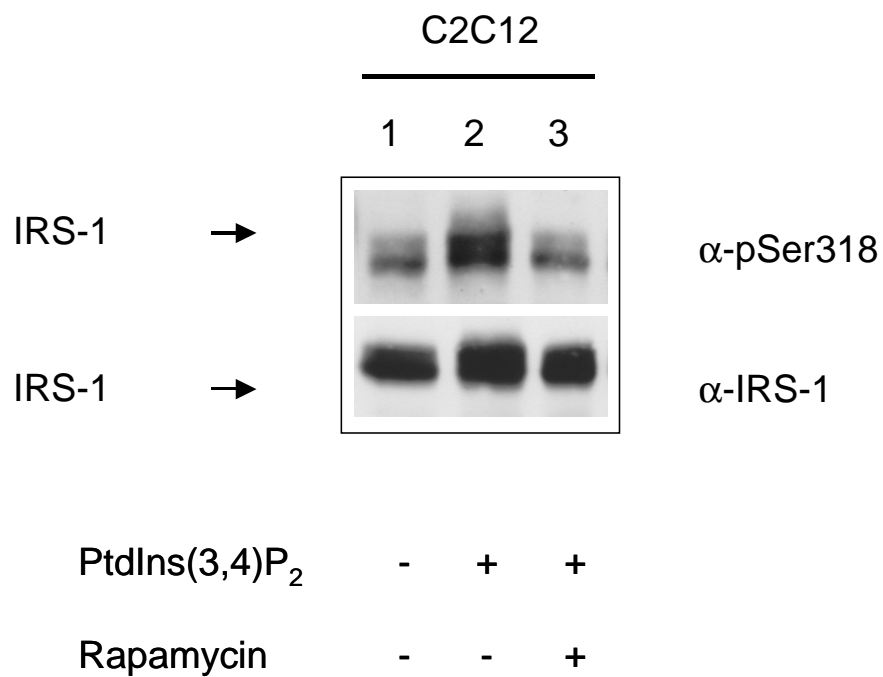


Abb. 11: Insulin-unabhängige Aktivierung von JNK bzw. des PI3-Kinase/mTOR Signalweges führt zu IRS-1 Ser318-Phosphorylierung. C2C12-Myotuben wurden für jeweils 30 min mit 25 µg/ml JNK-Aktivator Anisomycin (**A**), 5 mM mTOR-Aktivator Leucin (**B**) oder 10 µM PI3-Kinase-Substrat PtdIns(3,4)P₂ (**C**) mit oder ohne Vorinkubation (30 min) mit 50 µM JNK-Inhibitor SP600125 bzw. 25 nM mTOR-Inhibitor Rapamycin behandelt.

4. Diskussion

In einer vorangegangenen Studie konnte Ser318 als eine neue Phosphorylierungsstelle von IRS-1 identifiziert werden [Moeschel, K. et al., 2004]. Die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung wird durch PKC- ζ vermittelt, für welche gezeigt wurde, dass sie bereits kurz nach Insulinstimulation aktiviert wird [Standaert, M. L. et al., 1999]. Nachdem nun aber die Ser318-Phosphorylierung auch nach 60 min Insulinexposition noch immer deutlich erhöht ist, gingen wir der Frage nach, ob nach längerer Insulinbehandlung neben PKC- ζ noch weitere Kinasen an der Ser318-Phosphorylierung von IRS-1 beteiligt sein könnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Insulin und der Phorbol ester TPA in C2C12-Myotuben, einem Zellmodell für den Skelettmuskel, die Ser318-Phosphorylierung von IRS-1 deutlich verstärken. Andere Faktoren, wie etwa Glukose, TNF- α oder freie Fettsäuren, hingegen, für die bekannt ist, dass sie die Entwicklung der Insulinresistenz begünstigen, scheinen die Ser318-Phosphorylierung nicht oder nur in geringem Maße zu beeinflussen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung von IRS-1 durch JNK und den PI3-Kinase/mTOR-Signalweg vermittelt ist. Im Gegensatz dazu jedoch scheinen JNK, PI3-Kinase und mTOR bei der Phorbol ester-induzierten IRS-1-Ser318-Phosphorylierung keine bedeutende Rolle zu spielen. Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf die Beteiligung klassischer und/oder neuer PKC-Isoformen bei der Phorbol ester-stimulierten Ser318-Phosphorylierung hin, welche wiederum bei der Insulin-induzierten Ser318-Phosphorylierung keine Bedeutung zu haben scheinen. Im Gegensatz zur Phorbol ester-abhängigen Ser307-Phosphorylierung, für die eine Shp2-Abhängigkeit gezeigt werden konnte [Mussig, K. et al., 2005], scheint Shp2 bei der TPA-induzierten Ser318-Phosphorylierung von IRS-1 keine Rolle zu spielen.

Die Beobachtung, dass JNK die Insulin-induzierte Phosphorylierung einer Serinstelle vermittelt, für die gezeigt wurde, dass sie die Weiterleitung des Insulinsignals in der Zelle beeinträchtigt [Moeschel, K. et al., 2004], steht im

Einklang mit vorangegangenen Studien, die eine erhöhte JNK-Aktivität in verschiedenen Geweben bei diabetischer Stoffwechsellage sowie den Einfluss von JNK-abhängigen Signalwegen auf die Insulinwirkung gezeigt haben [Manning, A. M. et al., 2003; Hotamisligil, G. S., 2003]. Untersuchungen, bei denen das für JNK1 codierende Gen gezielt ausgeschaltet werden konnte, bestätigten die zentrale Rolle von JNK1 bei der Entwicklung der Insulinresistenz [Hirosumi, J. et al., 2002]. Ohne JNK1 zeigten die untersuchten Mäuse eine verminderte ernährungsbedingte Adipositas, niedrigere Nüchternblutzucker- und Nüchterninsulinspiegel unter einer fettreichen Ernährung und eine deutlich höhere Insulinempfindlichkeit sowohl in oralen als auch in intraperitonealen Glukosetoleranztesten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Darüber hinaus führte die Ausschaltung des für die JNK1 codierenden Gens in hyperinsulinämischen ob/ob-Mäusen zu - im Vergleich mit den Kontrolltieren - signifikant niedrigerem Körpergewicht sowie herabgesetzten Blutzucker- und Insulinspiegeln. Eine direkte Beteiligung von JNK an der intrazellulären Weiterleitung des Insulinsignals wurde bereits in vorangegangenen In-vitro-Studien diskutiert, die zeigen konnten, dass IRS-1 an Ser307 durch JNK phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung zu einer verminderten Insulin-stimulierten Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1 führt [Aguirre, V. et al., 2000]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen ist die durch Fettleibigkeit ausgelöste Ser307-Phosphorylierung im Lebergewebe von JNK1-knockout-Mäusen im Vergleich zu adipösen Wildtyp-Kontrollmäusen vollständig abgeschwächt und die IRS-1-Tyrosin-Phosphorylierung deutlich erhöht [Hirosumi, J. et al., 2002]. Wir zeigen nun, dass JNK auch an der Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 beteiligt ist.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass der PI3-Kinase-Signalweg die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung von IRS-1 vermittelt, stimmt mit vorangegangenen Studien überein, die zeigen konnten, dass die Insulin-induzierte Serin/Threonin-Phosphorylierung von IRS-1 und die daraus resultierende IRS-1-Proteindegradation in Adipozyten durch die Hemmung der PI3-Kinase- und mTOR-Aktivität blockiert wird [Pederson, T. M. et al., 2001]. Die Aktivierung des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges durch chronische

Behandlung mit Substanzen, wie etwa TNF- α [Ozes, O. N. et al., 2001], Insulin [Tremblay, F. et al., 2005; Pederson, T. M. et al., 2001] oder Aminosäuren [Tremblay, F. et al., 2001], die allesamt Insulinresistenz auslösen können, beeinträchtigt die Weiterleitung des intrazellulären Insulinsignals durch die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen an IRS-1 [Ozes, O. N. et al., 2001]. Verschiedene Studien legen nahe, dass die Rapamycin-empfindliche Serin-/Threonin-Phosphorylierung von IRS-1 direkt durch p70S6K-1 vermittelt wird [Ueno, M. et al., 2005; Khamzina, L. et al., 2005]. Die p70S6K-1 ist eine durch mTOR regulierte Serin-/Threonin-Kinase, die in der Folge der Insulin-induzierten Aktivierung des PI3-Kinase-Signalweges aktiviert wird [Hay, N. et al., 2004]. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung bestärkt, dass in Mäusen das Fehlen von p70S6K-1 protektiv gegen alters- und ernährungsbedingte Adipositas wirkt und die Insulinsensitivität steigert [Um, S. H. et al., 2004]. Verschiedene Serinstellen von IRS-1 wurden als Angriffspunkte des PI3-Kinase/mTOR/p70S6K-1-Signalweges identifiziert, darunter u.a. Ser302 [Werner, E. D. et al., 2004; Harrington, L. S. et al., 2004], Ser307 [Carlson, C. J. et al., 2004], Ser632 [Gual, P. et al., 2003] und Ser636 [Ozes, O. N. et al., 2001]. Dementsprechend war die Phosphorylierung von IRS-1 an Ser307 und Ser636 in Mäusen, denen p70S6K-1 fehlte, sowohl im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, die man ausschließlich mit fettreichen Kost ernährte, als auch zu genetisch bedingt adipösen K/K-A(y)- und ob/ob-Mäusen deutlich vermindert [Um, S. H. et al., 2004]. Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde ist derzeit keine sichere Aussage über eine Beteiligung der p70S6K an der Insulin-induzierten Ser318-Phosphorylierung von IRS-1 möglich, da mTOR IRS-1 auch direkt phosphorylieren könnte [Ozes, O. N. et al., 2001]. Die Lösung dieser Frage bleibt weiteren Experimenten vorbehalten.

Die Beobachtung, dass die Phosphorylierung an Ser318 nach einem ausgewählten Stimulus von verschiedenen Kinasen vermittelt wird, wurde in der Vergangenheit bereits für andere Phosphorylierungsstellen von IRS-1 gemacht. So wurde beispielsweise eine Beteiligung von JNK [Aguirre, V. et al., 2000], IKK- β [38], p70S6K-1 [Harrington, L. S. et al., 2004] und mTOR [Carlson, C. J. et al., 2004] an der TNF- α -induzierten Phosphorylierung von IRS-1 an Ser307

gefunden. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass die Phorbol-ester-induzierte Ser318-Phosphorylierung nicht durch die gleichen Kinasen vermittelt ist wie die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung. Es bleibt im Augenblick unklar, warum mehrere Kinasen an der Insulin-induzierten Phosphorylierung an Ser318 beteiligt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen jedoch einmal mehr die Komplexität der Insulin-induzierten IRS-1-Serin-Phosphorylierung und können vielleicht durch eine aufeinanderfolgende schrittweise Aktivierung von PKC- ζ , JNK und des PI3-Kinase/mTOR-Signalweges nach Insulinstimulation erklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Insulin-induzierte Ser318-Phosphorylierung zusätzlich zu PKC- ζ noch durch JNK und den PI3-Kinase/mTOR-Signalweg vermittelt wird. Die Phorbol-ester-induzierte Ser318-Phosphorylierung scheint durch klassische und/oder neue PKC-Isoformen vermittelt zu sein.

5. Zusammenfassung

Die genauen molekularen Mechanismen der Insulinresistenz, welcher eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 zukommt, sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist jedoch, dass die zelluläre Insulinresistenz u. a. mit einer vermehrten Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates-1 (IRS-1) an mehreren Serinen und Threoninen einhergeht. IRS-1 wird nach Stimulation mit dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat (TPA) bzw. Insulin an der kürzlich identifizierten Serinstelle 318 phosphoryliert. Der genaue Signalweg, der zu dieser Phosphorylierung führt, ist bislang nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit galt es daher zu untersuchen, ob Kinasen, für die beschrieben ist, dass sie IRS-1 phosphorylieren können, an dieser TPA- bzw. Insulin-induzierten Phosphorylierung beteiligt sind.

Die Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 wurde in C2C12-Myotuben mittels Western-Blotting nachgewiesen.

Die 30-minütige Stimulation mit TPA führte zu einer starken Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318. Durch 30-minütige Vorinkubation mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (500 nM), konnte die Phosphorylierung nach 30-minütiger Stimulation mit 100 nM TPA deutlich abgeschwächt und die Phosphorylierung nach 30-minütiger Stimulation mit 1 und 10 nM TPA auf das basale Niveau reduziert werden.

Die Stimulation mit 100 nM Insulin (30 min) führte ebenfalls zu einer starken Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318. Die Vorinkubation mit dem Inhibitor der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) SP600125 (50 μ M, 30 min) führte ebenso zu einer deutlichen Reduktion der Insulin-induzierten IRS-1-Phosphorylierung an Serin 318 wie der Einsatz des mammalian target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitors Rapamycin (25 nM) und des Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase-Inhibitors LY294002 (10 μ M).

Der JNK-Aktivitäts-Immunoassay zeigte eine Insulin-induzierte Phosphorylierung von c-Jun, die durch Vorinkubation mit SP600125 wieder auf das Basalniveau abgesenkt werden konnte. Die Insulin-Stimulation führte ebenfalls zu einer verstärkten Phosphorylierung der PI3-Kinase- und mTOR-Substrate Akt/Proteinkinase-B und p70S6-Kinase, die nach Vorinkubation mit LY294002 bzw. Rapamycin deutlich abnahm. Unsere Ergebnisse bestätigen also, dass PI3-Kinase, mTOR und JNK auch in unserem Zellsystem der C2C12-Myotuben durch Stimulation mit Insulin aktiviert werden.

Insulinunabhängig führte die Stimulation mit dem JNK-Aktivator Anisomycin (25 μ g/ml, 30 min), dem mTOR-Aktivator Leucin (5 mM, 30 min) und dem Produkt der PI3-Kinase PtdIns(3,4)P₂ (10 μ M, 30 min) zu einer verstärkten Ser318-Phosphorylierung, die mit den jeweils spezifischen Inhibitoren SP600125 (50 μ M, 30 min) bzw. Rapamycin (25 nM, 30 min) wieder auf das Basalniveau gesenkt werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen die Beteiligung von klassischen und/oder neuen PKC-Isoformen an der TPA-induzierten Ser318-Phosphorylierung nahe. Darüber hinaus weisen sie darauf hin, dass neben der PKC- ζ auch JNK und der PI3-Kinase/mTOR-Signalweg die Insulin-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318 vermitteln.

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Ampere (SI-Einheit der elektrischen Stromstärke)
Abb.	Abbildung
aPKC	atypische Proteinkinasen C
APS	Ammoniumpersulfat (Ammoniumperoxodisulfat)
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	Bisindolylmaleimid I
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius (Einheit für Temperatur)
cPKC	klassische Proteinkinasen C (engl. classical protein kinases C)
D	Dalton (Einheit für Größen von Proteine; 1 D = 1 g/mol)
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced-chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (engl.: extracellular-signal-regulated kinase)
FCS	Fötale Kälberserum (engl.: foetal calf serum)
g	Gramm (SI-Gewichtseinheit)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/Stunden (Einheit für Zeit)
HEPES	engl.: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
k	kilo- (1000)
l	Liter (Einheit für Volumen)
m	Meter (SI-Längeneinheit)
M	Molar (SI-Einheit für Stoffmengenkonzentration), 1 M = 1 mol/l
m	milli- (10^{-3})
μ	mikro- (10^{-6})
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP-Kinase/ERK
MEF	embryonale Mäusefibroblasten (engl.: mouse embryonic fibroblasts)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mol	Mol (SI-Substanzmengeneinheit)
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	nano- (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₄ P ₂ O ₇	Natriumpyrophosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
nPKC	neue Proteinkinasen C
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Natriumchlorid-Puffer (engl.: phosphate-buffered saline)

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

PDK	Phospholipid-abhängige Kinase (engl.: phospholipid-dependent kinase)
15dPGJ2	15-Desoxy-Prostaglandin J2
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdIns(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-(3,4)-Bisphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
s	Sekunde/Sekunden (SI-Einheit für Zeit)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
Ser	Serin
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: standard error of the mean)
Shp2	engl.: SH2-domain-containing protein-tyrosine phosphatase-2
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
V	Volt (Einheit für elektrische Spannung)

7. Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungen

Abb. 1 :

Ausschnitt aus der Insulinsignalkaskade

Abb. 2:

Zellkultur von C2C12-Myotuben

Abb. 3:

Insulin und TPA induzieren eine Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 318.

Abb. 4:

Konzentrationsreihen TPA- und Insulin-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318.

Abb. 5:

Zeitreihe TPA- bzw. Insulin-induzierter Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318.

Abb. 6:

Die TPA-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 ist zumindest teilweise durch klassische und/oder neue PKC-Isoformen vermittelt, die Insulin-induzierte Phosphorylierung an Ser318 jedoch nicht.

Abb. 7:

Die TPA-induzierte Phosphorylierung von IRS-1 an Ser318 ist nicht Shp2-abhängig.

Abb. 8:

JNK und der PI3-Kinase/mTOR-Weg vermitteln die Insulin-induzierte IRS-1-Ser318 Phosphorylierung.

Abb. 9:

JNK und der PI3-Kinase/mTOR-Weg vermitteln die TPA-induzierte IRS-1-Ser318 Phosphorylierung nicht.

Abb. 10:

JNK, PI3-Kinase und mTOR werden durch Insulinstimulation aktiviert.

Abb. 11:

Insulin-unabhängige Aktivierung von JNK bzw. des PI3-Kinase/mTOR Signalweges führt zu IRS-1-Ser318-Phosphorylierung.

7.2 Tabellen

Tabelle 1:

Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

8. Literaturverzeichnis

Aguirre, V.; Uchida, T.; Yenush, L.; Davis R.; White, M. F., The c-jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J.Biol.Chem.* 275 9047-9054 (2000)

Alessi, D. R.; James, S. R.; Downes, C. P.; Holmes, A. B.; Gaffney, P. R.; Reese, C. B.; Cohen, P., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr.Biol.* 7 [4]: 261-269 (1997)

Avignon, A.; Yamada, K.; Zhou, X.; Spencer, B.; Cardona, O.; Sabat-Siddique, S.; Galloway, L.; Standaert, M. L.; Farese, R. V., Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged, and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis. *Diabetes* 45 [10]: 1396-1404 (1996)

Bazzano, L. A.; Serdula, M.; Liu, S., Prevention of type 2 diabetes by diet and lifestyle modification. *J.Am.Coll.Nutr.* 24 [5]: 310-319 (2005)

Beck-Nielsen, H.; Groop, L. C., Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Invest* 94 [5]: 1714-1721 (1994)

Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72 248-254 (1976)

Calegari, V. C.; Alves, M.; Picardi, P. K.; Inoue, R. Y.; Franchini, K. G.; Saad, M. J.; Velloso, L. A., Suppressor of cytokine signaling-3 provides a novel interface in the cross-talk between angiotensin II and insulin signaling systems. *Endocrinology* 146 [2]: 579-588 (2005)

Campbell, I. W., Type 2 diabetes mellitus. The silent killer. *Practical Diabetes International* 18 [6]: 187-191 (2001)

Carlson, C. J.; White, M. F.; Rondinone, C. M., Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 316 [2]: 533-539 (2004)

Cengel, K. A.; Freund, G. G., JAK1-dependent phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) is inhibited by IRS-1 serine phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 274 [39]: 27969-27974 (1999)

Cohen, P.; Alessi, D. R.; Cross, D. A., PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett.* 410 [1]: 3-10 (1997)

Considine, R. V.; Nyce, M. R.; Allen, L. E.; Morales, L. M.; Triester, S.; Serrano, J.; Colberg, J.; Lanza-Jacoby, S.; Caro, J. F., Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *J.Clin.Invest* 95 [6]: 2938-2944 (1995)

Cusi, K.; Maezono, K.; Osman, A.; Pendergrass, M.; Patti, M. E.; Pratipanawatr, T.; DeFronzo, R. A.; Kahn, C. R.; Mandarino, L. J., Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin.Invest* 105 [3]: 311-320 (2000)

De Fea, K.; Roth, R. A., Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 272 [50]: 31400-31406 (1997)

DeFronzo, R. A.; Bonadonna, R. C.; Ferrannini, E., Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15 [3]: 318-368 (1992)

Freidenberg, G. R.; Reichart, D.; Olefsky, J. M.; Henry, R. R., Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J Clin.Invest* 82 [4]: 1398-1406 (1988)

Gao, Z.; Hwang, D.; Bataille, F.; Lefevre, M.; York, D.; Quon, M. J.; Ye, J., Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J.Biol.Chem.* 277 [50]: 48115-48121 (2002)

Gao, Z.; Zhang, X.; Zuberi, A.; Hwang, D.; Quon, M. J.; Lefevre, M.; Ye, J., Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol.Endocrinol.* 18 [8]: 2024-2034 (2004)

Gao, Z.; Zuberi, A.; Quon, M. J.; Dong, Z.; Ye, J., Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J.Biol.Chem.* 278 [27]: 24944-24950 (2003)

Gual, P.; Gremeaux, T.; Gonzalez, T.; Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J. F., MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 46 [11]: 1532-1542 (2003)

Gual, P.; Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J. F., Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87 [1]: 99-109 (2005)

Harrington, L. S.; Findlay, G. M.; Gray, A.; Tolkacheva, T.; Wigfield, S.; Rebholz, H.; Barnett, J.; Leslie, N. R.; Cheng, S.; Shepherd, P. R.; Gout, I.; Downes, C. P.; Lamb, R. F., The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J.Cell Biol.* 166 [2]: 213-223 (2004)

Hay, N.; Sonenberg, N., Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18 [16]: 1926-1945 (2004)

Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Gorgun, C. Z.; Uysal, K. T.; Maeda, K.; Karin, M.; Hotamisligil, G. S., A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420 [6913]: 333-336 (2002)

Hotamisligil, G. S., Inflammatory pathways and insulin action. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 27 Suppl 3 S53-S55 (2003)

Hotamisligil, G. S.; Peraldi, P.; Budavari, A.; Ellis, R.; White, M. F.; Spiegelman, B. M., IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271 [5249]: 665-668 (1996)

Idris, I.; Gray, S.; Donnelly, R., Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 44 [6]: 659-673 (2001)

Kasuga, M.; Zick, Y.; Blithe, D. L.; Crettaz, M.; Kahn, C. R., Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-receptor in a cell-free system. *Nature* 298 667-669 (1982)

Khamzina, L.; Veilleux, A.; Bergeron, S.; Marette, A., Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146 [3]: 1473-1481 (2005)

Krook, A.; Bjornholm, M.; Galuska, D.; Jiang, X. J.; Fahlman, R.; Myers, M. G., Jr.; Wallberg-Henriksson, H.; Zierath, J. R., Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49 [2]: 284-292 (2000)

Li, J.; De Fea, K.; Roth, R. A., Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J.Biol.Chem.* 274 9351-9356 (1999)

Manning, A. M.; Davis, R. J., Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat.Rev.Drug Discov.* 2 [7]: 554-565 (2003)

Moeschel, K.; Beck, A.; Weigert, C.; Lammers, R.; Kalbacher, H.; Voelter, W.; Schleicher, E. D.; Haring, H. U.; Lehmann, R., Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J.Biol.Chem.* 279 [24]: 25157-25163 (2004)

Molina, J. M.; Ciaraldi, T. P.; Brady, D.; Olefsky, J. M., Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* 38 [8]: 991-995 (1989)

Mussig, K.; Staiger, H.; Fiedler, H.; Moeschel, K.; Beck, A.; Kellerer, M.; Haring, H. U., Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. *J.Biol.Chem.* 280 [38]: 32693-32699 (2005)

Ozcan, U.; Cao, Q.; Yilmaz, E.; Lee, A. H.; Iwakoshi, N. N.; Ozdelen, E.; Tuncman, G.; Gorgun, C.; Glimcher, L. H.; Hotamisligil, G. S., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306 [5695]: 457-461 (2004)

Ozes, O. N.; Akca, H.; Mayo, L. D.; Gustin, J. A.; Maehama, T.; Dixon, J. E.; Donner, D. B., A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 [8]: 4640-4645 (2001)

Palitzsch, K.-D.; Nusser, J.; Arndt, H.; Enger, I.; Zietz, B., Die Prävalenz des Diabetes mellitus wird in Deutschland deutlich unterschätzt - eine bundesweite epidemiologische Studie auf der Basis einer HbA1c-Analyse. *Diabetes und Stoffwechsel* 8 189-200 (1999)

Pederson, T. M.; Kramer, D. L.; Rondinone, C. M., Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50 [1]: 24-31 (2001)

Ratzmann, K. P., Eine Analyse von alters- und geschlechtsspezifischer Diabetesprävalenz sowie Behandlungsart: die Berlin-Studie. *Akt.Endokr.Stoffw* 12 220-223 (1991)

Shepherd, P. R.; Withers, D. J.; Siddle, K., Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem.J.* 333 (Pt 3) 471-490 (1998)

Standaert, M. L.; Bandyopadhyay, G.; Perez, L.; Price, D.; Galloway, L.; Poklepovic, A.; Sajan, M. P.; Cenni, V.; Sirri, A.; Moscat, J.; Toker, A.; Farese, R. V., Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J.Biol.Chem.* 274 [36]: 25308-25316 (1999)

Sun, X. J.; Rothenberg, P.; Kahn, C. R.; Backer, J. M.; Araki, E.; Wilden, P. A.; Cahill, D. A.; Goldstein, B. J.; White, M. F., Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352 73-77 (1991)

Tremblay, F.; Gagnon, A.; Veilleux, A.; Sorisky, A.; Marette, A., Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 146 [3]: 1328-1337 (2005)

Tremblay, F.; Marette, A., Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J.Biol.Chem.* 276 [41]: 38052-38060 (2001)

Trichitta V; Brunetti, A; Chiavetta, A; Benzi, L; Papa, V; Vigneri, R, Defects in insulin-receptor internalization and processing in monocytes of obese subjects and obese NIDDM patients. *Diabetes* 38 1579-1584 (1989)

Ueno, M.; Carnevali, J. B.; Tambascia, R. C.; Bezerra, R. M.; Amaral, M. E.; Carneiro, E. M.; Folli, F.; Franchini, K. G.; Saad, M. J., Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia* 48 [3]: 506-518 (2005)

Um, S. H.; Frigerio, F.; Watanabe, M.; Picard, F.; Joaquin, M.; Sticker, M.; Fumagalli, S.; Allegrini, P. R.; Kozma, S. C.; Auwerx, J.; Thomas, G., Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431 [7005]: 200-205 (2004)

Voet, D; Voet, J. G.; Pratt, C. W., Lehrbuch der Biochemie. *Wiley-VCH Verlag GmbH* (2002)

Wallberg-Henriksson, H., Interaction of exercise and insulin in type II diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15 [11]: 1777-1782 (1992)

Werner, E. D.; Lee, J.; Hansen, L.; Yuan, M.; Shoelson, S. E., Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J.Biol.Chem.* 279 [34]: 35298-35305 (2004)

White, M. F., The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent.Prog Horm.Res* 53 119-138 (1998)

White, M. F.; Kahn, C. R., Cascade of autophosphorylation in the beta-subunit of the insulin receptor. *J.Cell Biochem.* 39 [4]: 429-441 (1989)

White, M. F.; Kahn, C. R., The insulin signaling system. *J.Biol.Chem.* 269 1-4 (1994)

Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H., Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27 [5]: 1047-1053 (2004)

Wilden, P. A.; Kahn, C. R., The level of insulin receptor tyrosine kinase activity modulates the activities of phosphatidylinositol 3-kinase, microtubule-associated protein, and S6 kinases. *Mol.Endocrinol* 8 [5]: 558-567 (1994)

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Mai 2004 bis August 2005 in der Abteilung für Endokrinologie, Diabetologie, Angiologie, Nephrologie und Klinische Chemie an der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-U. Häring.

Herrn **Prof. Dr. Häring** danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor, die interessante Aufgabenstellung, seine freundliche Unterstützung, sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Karsten Müssig** für eine großartige Betreuung, die wirklich nicht besser hätte sein können und für die große Unterstützung beim Erlernen der zellbiologischen und proteinbiochemischen Methoden. Seine fachlichen Anregungen und Ideen sowie seine Anleitung waren in der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, für mich ebenso wichtig wie seine aufmunternden Worte und seine ansteckend große Energie.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus **Dr. Harald Staiger**, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und von dessen großer Erfahrung ich viel profitieren konnte. Auch er war über die großartige fachliche Betreuung hinaus ein wichtiger Ansprechpartner in allen anstehenden Fragen.

Weiter möchte ich den lieben Kollegen **Dr. Katrin Staiger, Carina Haas, Martina Melzer, Doro Neuscheler, Mary-Ann Schneider, Dr. Peter Weyrich und PD Dr. Reiner Lammers** danken, die mir mit ihrer langjährigen Erfahrung oft weiterhelfen konnten und immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten.

Danken möchte ich außerdem den Kollegen aus den Nachbarlaboren **Annika Sunnanväder, Angela Queisser, Xuehui He, Martin Heni und Marc Becker** für die gute Stimmung, die immer bei uns herrschte.

Meiner Familie und Freunden vielen Dank für ihr Verständnis und ihre Unterstützung. Der größte Dank aber gebührt meinen Eltern, die auf vieles in ihrem Leben verzichtet haben, um uns das Studium und schließlich auch die Promotion zu ermöglichen und uns immer in allem unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Hendrik Fiedler

Geburtstag: 20. September 1980

Geburtsort: Celle

Schulbildung:

09/1987 – 07/1988	Grundschule Burgdorf
09/1988 – 07/1991	Reinhold-Maier-Grundschule Schorndorf-Weiler
09/1991 – 06/2000	Burg-Gymnasium Schorndorf
21.06.2000	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst:

07/2000 – 05/2001	DRK Rettungsdienst, Kreisverband Rems-Murr, Ausbildung zum Rettungssanitäter
-------------------	---

Studium:

seit 10/2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls- Universität zu Tübingen
--------------	--

10.09.2003	Zeugnis über die Ärztliche Vorprüfung
------------	---------------------------------------

Famulaturen:

02/2004 – 03/2004	Anästhesiologie und Intensivmedizin, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen
03/2004 – 04/2004	Plastische- und Wiederherstellungschirurgie, Klinikum Rechts der Isar, München

09/2004 – 10/2004 Endokrinologische Ambulanz, Diabetes-Ambulanz,
Medizinische Klinik, Uniklinik Tübingen

03/2005 – 04/2005 Interdisziplinäre Notaufnahme, Medizinische Klinik,
Uniklinik Tübingen

02/2006 – 04/2006 Emergency Medicine, Sunnybrook Health Sciences
Center, University of Toronto, Kanada

Praktisches Jahr:

08/2006 – 12/2006 Anästhesiologie und operative Intensivmedizin,
Katharinenhospital, Klinikum Stuttgart

12/2006 – 04/2007 Internal Medicine, New Somerset Hospital, University of
Cape Town, Südafrika

04/2007 – 07/2007 Chirurgie, Kantonsspital Baden AG, Schweiz

27.05.2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung